



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Efecto citotóxico, antitumoral, antioxidante in vitro y antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. Y estructura química de sus flavonoides

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Gustavo Adolfo FERNÁNDEZ REBAZA

ASESORES

Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Jorge Luis ARROYO ACEVEDO

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Fernández G. Efecto citotóxico, antitumoral, antioxidante in vitro y antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. Y estructura química de sus flavonoides [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Efecto citotóxico, antitumoral, antioxidante *in vitro* y antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. Y estructura química de sus flavonoides

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

GUSTAVO ADOLFO FERNÁNDEZ REBAZA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Diecinueve (19) aciertos

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 06 de setiembre de 2018.

Dr. Américo Jorge Castro Luna
Presidente

Dra. Yadira Fernández Jeri
Miembro

Dr. Víctor Luis Izaguirre Pasquel
Miembro

Mg. Luis Alberto Rojas Ríos
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi soporte, dirección y perseverancia para realizar el presente trabajo de investigación.

A mis padres Mery y Noe, por su confianza, paciencia, comprensión y apoyo a lo largo de la vida y enseñarme los valores para el desarrollo personal y profesional.

A mis hermanos Joe y Noelia, por ser mis grandes amigos, consejeros en momentos difíciles y brindarme siempre su apoyo incondicional en cada etapa. Además, ellos representaron mi fuerza y motivo para ingresar a esta gran universidad y seguir adelante.

A mi maestro y gran amigo, Dr. Pablo Bonilla, por ser mi gran guía en el área de investigación multidisciplinaria de productos naturales y brindarme su confianza y comprensión en cada paso durante todos estos años.

A los asistentes de investigación del Dr. Bonilla, por su emprendimiento y perseverancia en la investigación de productos naturales.

A mis profesores por brindarme su confianza, amistad y conocimientos en las diferentes áreas para un excelente desarrollo profesional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser siempre mi guía y soporte en los momentos difíciles, entregándome las fuerzas para seguir adelante. Además, por presentarme grandes personas en el camino para cumplir mis metas en beneficio de la salud de las personas.

Al Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, asesor del presente trabajo y gran maestro, por su apoyo, guía, paciencia, confianza, amistad, comprensión y grandes enseñanzas para la vida. Presente ante cualquier dificultad, consulta, sugerencia o mejora en diferentes aspectos como también receptivo a nuevas ideas, proyectos y técnicas brindando su soporte y conocimientos en cada paso.

A los asistentes del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales, Analucía Toche, Vianella Curay, Sebastian Osorio, Josehp Vilcaluri, Eliezer Bonifacio, Jhan Paolo Gosgot, Lino Quispe, Joel Juarez, Manuel Rios y Livia Pumacayo por su amistad, apoyo, tiempo, confianza, diligencia y disposición.

Al PhD. Abraham Vaisberg de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su apoyo y asesoría en el efecto antitumoral.

Al coasesor Dr. Jorge Luis Arroyo del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, por su colaboración y asesoría en el efecto antiinflamatorio.

A la Dra. Silvia Suárez del Departamento de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina, por su apoyo, paciencia y conocimientos en la actividad antioxidante.

Al Mg. Fernando Retuerto de la Facultad de Ciencias Biológicas, por su apoyo y asesoría en el efecto citotóxico.

Al Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por su apoyo y evaluación de la investigación.

A los miembros del jurado (Presidente: Dr. Américo Castro, Miembros: Dra. Yadira Fernández, Dr. Victor Izaguirre y Mg. Luis Rojas) por su apoyo en la revisión.

A mi papá Noe Fernández, por su preocupación, consejos y aliento en seguir adelante. A mi mamá Mery Rebaza por ser mi guía, soporte y amiga. Por su gran esfuerzo por contribuir a lograr mis metas y objetivos propuestos y brindarme la fortaleza para enfrentar cada reto en cada etapa de mi vida.

A mi hermano, Joe por siempre estar ahí apoyándome, escuchándome, entendiéndome, aconsejándome y ser mi gran amigo. A mi hermana Noelia, por ser mi motivo para seguir adelante, mi gran amiga, mi apoyo desde que ella era pequeña, mi compañera de investigación, por su cariño y cuidados cada momento.

A mis tíos Eduardo Rebaza y Janeth García, por su apoyo incondicional y confianza.

Al herbolario Don Ramiro Valencia por su apoyo, humildad y conocimientos.

A Eliana Yauce por brindarme su apoyo, motivación y fuerza en cada momento.

Al Sr. Reynaldo Madrid del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina por su amistad, apoyo y disposición en el efecto antiinflamatorio.

A la Mg. Margarita Lobatón y Q.F. Eva Ramos del Laboratorio de Botánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por su apoyo en el análisis anatómico vegetal.

A la Dra. Maria Elena Salazar y Mg. Francisco Javier Ramírez, profesores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por brindarme su confianza y colaboración.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación une la tradición y la ciencia para el potencial beneficio de la salud de las personas. **Objetivos.** Proponer la estructura de flavonoides y determinar la citotoxicidad, efecto antitumoral en líneas celulares, actividad antioxidante *in vitro* y efecto antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. **Métodos.** Se preparó un extracto alcohólico de hojas y se realizó el análisis anatómico vegetal e investigación fitoquímica mediante marcha de solubilidad, tamizaje fitoquímico, cromatografía y espectroscopia UV/Vis. Asimismo, se realizó los ensayos preclínicos de citotoxicidad en embriones de erizo de mar, efecto antitumoral en las líneas celulares BALB/c 3T3, M-14 y HT-29, actividad antioxidante *in vitro* por los métodos ABTS⁺ y DPPH; y el efecto antiinflamatorio se realizó en ratas albinas hembras cepa Holtzman de 2,5 meses. **Resultados.** El análisis anatómico de la hoja mostró un tipo mesomórfico. El extracto alcohólico fue soluble en solventes polares y de mediana polaridad. Los metabolitos secundarios encontrados en el tamizaje fitoquímico fueron taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides; entre otros. Se propone nueve estructuras químicas de flavonoides mediante análisis espectroscópico UV/Vis. Los ensayos preclínicos, evidenciaron efecto citotóxico del extracto en erizo de mar a 200 µg/mL. La fracción 1 del extracto expresó los GI₅₀ de 78,05 µg/mL para la línea celular tumoral M-14 y 69,52 µg/mL para la línea celular tumoral HT-29. En la actividad antioxidante *in vitro* empleando ABTS⁺ y DPPH, el extracto manifestó los IC₅₀ de 8,39 µg/mL y 13,58 µg/mL, respectivamente. El extracto mostró un mayor efecto antiinflamatorio *in vivo* en ratas a la dosis de 25 mg/kg. **Conclusiones.** Se propone nueve estructuras de flavonoides presentes en el extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. Asimismo, los metabolitos secundarios del extracto alcohólico presentaron efecto citotóxico en embriones de erizo de mar, efecto antitumoral en líneas celulares, actividad antioxidante *in vitro* y efecto antiinflamatorio en ratas cepa Holtzman.

Palabras clave: ***Hesperomeles cuneata***, flavonoides, citotoxicidad, antitumoral, antioxidante, antiinflamatorio.

SUMMARY

This work of research unites tradition and science for the potential benefit of the health of the people. **Objectives.** Propose the structure of flavonoids and determining cytotoxicity, antitumor effect in cell lines, *in vitro* antioxidant activity and anti-inflammatory effect of the alcoholic extract of leaves of ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. **Methods.** Prepared an alcoholic extract of leaves and anatomical plant analysis and phytochemical research through march of solubility, phytochemical screening, chromatography and UV/Vis spectroscopy were performed. Also executed preclinical trials of cytotoxicity in sea urchin embryos, antitumor effect in BALB/c 3T3, M-14 y HT-29 cell lines, *in vitro* antioxidant activity by ABTS⁺ and DPPH methods; and the anti-inflammatory effect was performed in female albino rats Holtzman strain of 2,5 months. **Results.** The anatomical analysis of leaf showed a mesomorphic. The alcoholic extract was soluble in polar solvents and of medium polarity. The secondary metabolites found in the phytochemical screening were tannins, phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, among others. Propose nine chemical structure of flavonoids by UV/Vis spectroscopic analysis. Preclinical trials, presented cytotoxic effect of extract in sea urchin to 200 µg/mL. Fraction 1 of the extract expressed the GI50 of 78.05 µg/mL for the tumor cell line M-14 and 69.52 µg/mL for the HT-29 tumor cell line. In the *in vitro* antioxidant activity using using ABTS⁺ and DPPH, the extract showed the IC50 of 8.39 µg/mL and 13.58 µg/mL, respectively. The extract showed a greater *in vivo* anti-inflammatory effect in rats at a dose of 25 mg/kg. **Conclusions.** Nine structures of flavonoids present in the alcoholic extract of leaves of ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. are proposed. Likewise, the secondary metabolites of the alcoholic extract showed cytotoxic effect in sea urchin embryos, antitumor effect in cell lines, *in vitro* antioxidant activity and anti-inflammatory effect in Holtzman strain rats.

Key words: ***Hesperomeles cuneata***, flavonoids, cytotoxicity, antitumor, antioxidant, anti-inflammatory.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	V
SUMMARY	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general.....	3
1.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
II. GENERALIDADES.....	4
2.1. Antecedentes.....	4
2.2. Marco teórico.....	6
2.2.1. Aspecto botánico.....	6
2.2.2. Citotoxicidad.....	8
2.2.3. Cáncer y antineoplásicos.....	9
2.2.4. Estrés oxidativo y antioxidantes.....	12
2.2.5. Inflamación y antiinflamatorios.....	16
2.2.6. Flavonoides y propiedades farmacológicas.....	19
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	22
3.1. Tipo de investigación.....	22
3.2. Diseño de investigación.....	22

3.3.	Materiales.....	23
3.4.	Metodología.....	25
3.4.1.	Recolección de la planta.....	25
3.4.2.	Clasificación taxonómica.....	25
3.4.3.	Acondicionamiento de la muestra.....	25
3.4.4.	Secado y reducción de tamaño.....	25
3.4.5.	Elaboración del extracto.....	25
3.4.6.	Análisis anatómico vegetal.....	26
3.4.7.	Investigación fitoquímica.....	26
3.4.8.	Ensayos preclínicos.....	28
IV.	RESULTADOS.....	34
4.1.	Análisis anatómico vegetal.....	34
4.2.	Investigación fitoquímica.....	35
4.2.1.	Marcha de solubilidad.....	35
4.2.2.	Tamizaje fitoquímico.....	36
4.2.3.	Cromatografía.....	37
4.2.3.1.	Cromatografía en capa fina analítica.....	37
4.2.3.2.	Cromatografía en capa fina preparativa.....	39
4.2.3.3.	Cromatografía en columna rápida.....	40
4.2.4.	Espectroscopia UV/Vis.....	40
4.3.	Ensayos preclínicos.....	45
4.3.1.	Efecto citotóxico.....	45
4.3.2.	Efecto antitumoral.....	47
4.3.3.	Actividad antioxidante.....	55

4.3.3.1.	Actividad antioxidante empleando ABTS ⁺	55
4.3.3.2.	Actividad antioxidante empleando DPPH.....	56
4.3.4.	Efecto antiinflamatorio.....	58
V.	DISCUSIÓN.....	60
VI.	CONCLUSIONES.....	70
VII.	RECOMENDACIONES.....	71
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
IX.	ANEXOS.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE: Antiinflamatorios no esteroideos

***Ad libitum*:** Expresión latina “a voluntad”

FeCl₃: Tricloruro férrico

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

ANOVA: Análisis de varianza

SRB: Sulforodamida B

IC₅₀: Concentración inhibitoria media

ABTS: 2,2'-azinobis (3 –etilbenzotiazolín) – 6- sulfónico

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo

NH₄: Amoniacó

Az: Azúcar

EtOH: Etanol

ET: Extracto total

F1: Fracción 1

F2: Fracción 2

F3: Fracción 3

5FU: 5-Fluorouracilo

GI50: Concentración inhibitoria de crecimiento del 50 % de células

BALB/c 3T3: Línea celular de fibroblastos normales de embrión de ratón BALB/c

M-14: Línea celular de melanoma amelanótico humano

HT-29: Línea celular de adenocarcinoma de colon humano

IS: Índice de selectividad

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al Trolox

SSF: Solución de suero fisiológico

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Planta entera de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl.....	6
Figura 2. Flujograma de investigación.....	22
Figura 3. Análisis anatómico vegetal.....	34
Figura 4. Marcha de solubilidad.....	35
Figura 5. Tamizaje fitoquímico.....	36
Figura 6. Cromatografía en capa fina analítica del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. frente a estándares y revelado en luz UV 254 y 365 nm.....	37
Figura 7. Cromatografía en capa fina analítica del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y utilizando reveladores cromogénicos.....	39
Figura 8. Cromatografía en capa fina preparativa del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y revelado en luz UV 254 y 365 nm.....	39
Figura 9. Estructuras químicas propuestas tipo flavonoides presentes en el extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. 1) Espectro UV/Vis; 2) Estructura química propuesta.....	44
Figura 10. Desarrollo de embriones de erizo de mar frente al extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y control a las 48 horas.....	45
Figura 11. Desarrollo embrionario del erizo de mar.....	46

Figura 12. Crecimiento de la línea celular BALB/c 3T3. 1) Tratamiento con extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y sus fracciones; 2) Control positivo (5-Fluorouracilo).....	48
Figura 13. Crecimiento de la línea celular M-14. 1) Tratamiento con extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y sus fracciones; 2) Control positivo (5-Fluorouracilo).....	50
Figura 14. Crecimiento de la línea celular HT-29. 1) Tratamiento con extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y sus fracciones; 2) Control positivo (5-Fluorouracilo).....	52
Figura 15. Concentración inhibitoria de crecimiento del 50 % de células (GI50) del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo) frente a las líneas celulares.....	53
Figura 16. Índice de selectividad del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo) frente a las líneas celulares	54
Figura 17. Porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical ABTS ^{•+}	55
Figura 18. Porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical DPPH.....	57
Figura 19. Medición del edema subplantar a los grupos controles y tratamiento con extracto alcohólico a diferentes dosis frente al tiempo.....	58

Figura 20. Eficiencia antiinflamatoria del extracto alcohólico a diferentes dosis y controles	59
Figura 21. Gónadas del erizo de mar (<i>Tetrapygus niger</i>). 1) Gónadas femeninas; 2) Gónadas masculinas.....	91
Figura 22. Distintas concentraciones del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. en agua de mar filtrada.....	91
Figura 23. Citotoxicidad sobre la línea celular HT-29 del tratamiento con extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo).....	92
Figura 24. Actividad antioxidante empleando radical ABTS ^{•+} 1) Extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. 2) Estándar Trolox.....	94
Figura 25. Actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical ABTS ^{•+}	94
Figura 26. Actividad antioxidante empleando radical DPPH 1) Extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. 2) Estándar Trolox.....	96
Figura 27. Actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical DPPH.....	96
Figura 28. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio en medición basal.....	99
Figura 29. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 60 minutos.....	100
Figura 30. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 180 minutos.....	100

Figura 31. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 240 minutos.....	101
Figura 32. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 300 minutos.....	101
Figura 33. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 360 minutos.....	102
Figura 34. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 420 minutos.....	102
Figura 35. Ratas albinas cepa Holtzman utilizadas para la medición del efecto antiinflamatorio.....	103
Figura 36. Asesor de la tesis: Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera.....	104
Figura 37. Investigación fitoquímica de la tesis.....	104

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Valores de absorción para las bandas I y II de los diferentes tipos de flavonoides.....	21
Tabla 2. Marcha de solubilidad del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl.....	35
Tabla 3. Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl.....	36
Tabla 4. Fraccionamiento de 8 g del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. al realizar cromatografía en columna rápida.....	40
Tabla 5. Porcentaje de desarrollo de embriones de erizo de mar frente al control y extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. a las 48 horas.....	45
Tabla 6. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de fibroblastos normales de embrión de ratón BALB/c 3T3 frente al tratamiento con extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y sus fracciones.....	47
Tabla 7. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de fibroblastos normales de embrión de ratón BALB/c 3T3 frente al control positivo (5-Fluorouracilo).....	47
Tabla 8. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de melanoma amelanótico humano M-14 frente al tratamiento con extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y sus fracciones.....	49

Tabla 9. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de melanoma amelanótico humano M-14 frente al control positivo (5-Fluorouracilo).....	49
Tabla 10. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 frente al tratamiento con extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y sus fracciones.....	51
Tabla 11. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 frente al control positivo (5-Fluorouracilo).....	51
Tabla 12. Concentración inhibitoria de crecimiento del 50 % de células (GI50) del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo) frente a las líneas celulares.....	53
Tabla 13. Índice de selectividad (IS) del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo) frente a las líneas celulares	54
Tabla 14. Porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical ABTS ⁺	55
Tabla 15. Concentración inhibitoria media (IC50) y capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical ABTS ⁺	56
Tabla 16. Porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical DPPH.....	56

Tabla 17. Concentración inhibitoria media (IC50) y capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical DPPH	57
Tabla 18. Medición del edema subplantar inducido por carragenina a los grupos controles y tratamiento con extracto a diferentes dosis frente al tiempo.....	58
Tabla 19. Porcentaje de eficiencia antiinflamatoria del extracto alcohólico a diferentes dosis y controles	59
Tabla 20. Actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical ABTS ⁺	93
Tabla 21. Actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. empleando radical DPPH.....	95
Tabla 22. Test de homogeneidad de varianzas del efecto antiinflamatorio.....	97
Tabla 23. Análisis descriptivo del efecto antiinflamatorio.....	98
Tabla 24. Análisis de varianza (ANOVA) del efecto antiinflamatorio.....	99

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo I. Constancia taxonómica de la planta.....	88
Anexo II. Certificado de adquisición de animales del bioterio del Instituto Nacional de Salud.....	89
Anexo III. Documento de aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.....	90
Anexo IV. Efecto citotóxico en embriones de erizo de mar.....	91
Anexo V. Efecto citotóxico sobre la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29.....	92
Anexo VI. Actividad antioxidante empleando radical ABTS ⁺	93
Anexo VII. Actividad antioxidante empleando radical DPPH.....	95
Anexo VIII. Análisis estadístico del efecto antiinflamatorio <i>in vivo</i>	97
Anexo IX. Animales utilizados en el efecto antiinflamatorio <i>in vivo</i>	103
Anexo X. Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”	104

I. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional, a través de las plantas medicinales forma parte esencial del legado de las culturas precolombinas, cuyo conocimiento se ha transmitido por generaciones hasta la actualidad ¹.

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas, el cual puede empezar en cualquier parte del cuerpo. Además, su tratamiento involucra una coordinación de distintas especialidades. Sin embargo, la toxicidad de los medicamentos antineoplásicos afecta a la medula ósea y también a diferentes órganos ².

El estrés oxidativo es una condición que se presenta cuando la producción de especies reactivas de oxígeno sobrepasa la capacidad para contrarrestarlas y eliminarlas, lo cual genera daño celular y tisular ³.

La inflamación es un proceso fisiológico de reacción de tejidos vascularizados ante lesión o muerte celular, caracterizándose por la generación de mediadores inflamatorios y el movimiento de líquido y leucocitos del sistema vascular a los tejidos extravasculares ³.

Los metabolitos secundarios son componentes de las plantas, los cuales presentan diferentes efectos en el organismo, tales como antiinflamatorios, cicatrizantes, antioxidantes, diuréticos, gastroprotector y últimamente antitumorales ⁴.

Los flavonoides son metabolitos secundarios de la mayoría de las plantas y exhiben un amplio espectro de beneficios para la salud tales como antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianos, entre otras ⁴. Además, los flavonoides se

encuentran en mezclas como agliconas y/o glicósidos, siendo más comunes los flavonoles y flavonas, y en menor frecuencia las chalconas, auronas e isoflavonas⁵.

En la actualidad, se continúan con las investigaciones de plantas medicinales de nuestro territorio uniendo la tradición y la ciencia para el beneficio de la salud de las personas y la búsqueda de potenciales fitofármacos.

Por ello, el presente estudio tiene como objetivo determinar la citotoxicidad, efecto antitumoral en líneas celulares, actividad antioxidante *in vitro* y antiinflamatorio en ratas del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. y estructura química de sus flavonoides.

Formulación del problema:

¿Los metabolitos secundarios del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. presentarán citotoxicidad, efecto antitumoral en líneas celulares; actividad antioxidante *in vitro* y efecto antiinflamatorio en ratas?

1.1. Objetivo general

- Analizar la estructura de flavonoides, citotoxicidad, efecto antitumoral en líneas celulares, actividad antioxidante *in vitro* y efecto antiinflamatorio en ratas del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl.

1.2. Objetivos específicos

- 1) Proponer la estructura de flavonoides presentes en el extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl.
- 2) Determinar la citotoxicidad en embriones de erizo de mar del extracto alcohólico de hojas ***Hesperomeles cuneata*** Lindl.
- 3) Determinar el efecto antitumoral en líneas celulares del extracto alcohólico de hojas ***Hesperomeles cuneata*** Lindl.
- 4) Determinar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl.
- 5) Determinar el efecto antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. en ratas cepa Holtzman.

1.3. Hipótesis

Los metabolitos secundarios del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. presentan citotoxicidad, efecto antitumoral en líneas celulares; actividad antioxidante *in vitro* y efecto antiinflamatorio en ratas.

II. GENERALIDADES

2.1. Antecedentes

La infusión de la planta, en particular de las hojas y ramas, se usa para tratar afecciones del hígado, riñones y para calmar el dolor de estómago. Además, las hojas, en infusión se usan para tratar el dolor de cabeza ⁶. La planta en estudio se extiende desde los 2 500-3 100 metros de altitud en los andes del norte del país ⁷.

Además, se ha reportado que los glicósidos de flavona están presentes en el género *Hesperomeles*. También se han detectado glucósidos de naringenina y eriodictiol en el género *Hesperomeles* ³.

Por otra parte, en otra investigación sobre la misma familia de la planta en estudio (Rosaceae), muestran la presencia de flavonoides y polifenoles en *Eriobotrya japonica*, cuyas hojas son usados en el tratamiento de enfermedades de la piel y diabetes mellitus en Japón ⁹.

Los flavonoides han demostrado ser posibles alternativas a las moléculas clásicamente utilizadas como agentes antiinflamatorios. De hecho, las actividades biológicas de los flavonoides incluyen la modulación de las diversas fases de los procesos inflamatorios, desde la transcripción y expresión génica hasta la inhibición de las actividades enzimáticas y la eliminación de las especies reactivas ¹⁰.

Los estudios en cultivo celular y modelos animales, así como un número limitado de estudios clínicos, revelan las propiedades hipolipemiantes, insulino-sensibilizantes, antihipertensivas y antiinflamatorias de los flavonoides cítricos

(tales como naringenina, hesperetina, nobiletina y tangeretina), los cuales rompen la respuesta inflamatoria en tejidos metabólicamente importantes incluyendo el hígado, el riñón y la aorta ¹¹.

Las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides han sido estudiadas recientemente, con el fin de establecer y caracterizar su potencial utilidad como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Se han propuesto varios mecanismos de acción para explicar las acciones antiinflamatorias de flavonoides *in vivo*, tales como la actividad antioxidante, la inhibición de las enzimas generadoras de eicosanoides o la modulación de la producción de moléculas proinflamatorias. Estudios recientes también han mostrado que algunos flavonoides son moduladores de la expresión génica proinflamatoria, llevando así a la atenuación de la respuesta inflamatoria ¹².

Los antioxidantes naturales presentes en la dieta incrementan la resistencia hacia los daños oxidativos y ellos pueden tener un impacto en la salud humana. Además, se ha reportado que una dieta rica en antioxidantes, como polifenoles, carotenoides, terpenoides y flavonoides protegen contra el daño celular ¹³. Asimismo se ha encontrado en estudios una buena actividad antioxidante en el género *Hesperomeles* el cual está relacionado a sus componentes fenólicos y flavonoides ¹⁴. Por otra parte, en varios estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado el potencial de los polifenoles contra diferentes enfermedades incluido el cáncer¹⁵. Teniendo el caso de la quercetina, un polifenol dietético, siendo beneficioso en la prevención y terapia del cáncer porque diferentes concentraciones de quercetina contrarrestan la transformación y el crecimiento en el proceso del cáncer ¹⁶.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Aspecto botánico

2.2.1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica se llevó a cabo en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, quien nos emitió la constancia respectiva (**Anexo I**). Presenta la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

Reino: PLANTAE

División: MAGNOLIOPHYTA

Clase: MAGNOLIOPSIDA

Subclase: ROSIDAE

Orden: ROSALES

Familia: ROSACEAE

Género: *Hesperomeles*

Especie: *Hesperomeles cuneata* Lindl.



Figura 1. Planta entera de *Hesperomeles cuneata* Lindl.

Fuente: Propia.

2.2.1.2. Descripción morfológica

La familia Rosaceae son hierbas, arbustos o árboles; estipulas persistentes o caducas, hojas alternas simples o compuestas. Inflorescencia solitaria, cimosas o racimosa, flores bisexuales, sépalos 4-5, pétalos 5 o ausentes, estambres numerosos, hipóginos, períginos o epíginos. Fruto una drupa o drupéolas, un pomo, folículos o un aquenio ¹⁷.

El género *Hesperomeles* son árboles o arbustos densamente ramificados, ramas algunas veces espinosas. Hojas simples, alternas, coriáceas o semicoriáceas, obovadas a elípticas, margen aserrada o cremada, lámina glabra o tomentosa. Cima corimbosa; flores perfectas con hipantio, 5 sépalos triangulares o subulados; 5 pétalos orbiculares, imbricados blancos con rojo o cremas; disco glabro o tomentoso; 18-20 estambres; ovario ínfero, 5-carpelar, 5 - locular. Pomo modificado, rojo a púrpura ¹⁷. ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. es una especie leñosa espinosa de hasta 1,5 m de alto con flores blancas y frutos rojos ¹⁸. Es conocida vulgarmente como “muchqui, mucti, melo, yanakasha” ¹⁹.

2.2.1.3. Distribución geográfica

Se encuentran en el piso superior de los departamentos de Cajamarca, Junín, La Libertad, Ancash, Huánuco, Lambayeque, Lima, Cerro de Pasco y Ayacucho¹⁸, el cual se extiende desde los 2 500- 3 100 metros de altitud, caracterizándose por arbustos mesotérmicos dispersos y estepas de gramíneas²⁰.

2.2.1.4. Uso tradicional

La infusión de la planta, en particular de las hojas y ramas, se usa para tratar afecciones del hígado, riñones y para calmar el dolor de estómago. Además, las hojas, en infusión se usan para tratar el dolor de cabeza, heridas, coágulos de sangre en mujeres recién dadas a luz ⁶.

El fruto es comestible y se usa para preparar dulces, coladas y mermeladas. El tallo es maderable, se emplea como postes y pilares en la construcción y como materia prima para la fabricación de aritos para el tambor, arados, entre otras ⁶.

2.2.2. Citotoxicidad

La citotoxicidad es la capacidad para interaccionar con otras células y destruirlas ²¹. El bioensayo de citotoxicidad en embriones de erizo de mar es un indicador sensible de toxicidad y mutagenicidad, siendo este bioensayo económico, rápido y dinámico a diferentes sustancias con posible actividad citotóxica ²².

El bioensayo de citotoxicidad mediante Sulforodamida B (SRB) es uno de los más empleados para la detección de citotoxicidad *in vitro* de drogas contra diferentes tipos de líneas celulares tumorales y no tumorales ^{23,24, 25}.

Por otra parte, los efectos tóxicos de los fármacos pueden dividirse en farmacológicos, patológicos, citotóxicos o genotóxicos, y su incidencia y gravedad presentan relación con la concentración de la sustancia en el individuo y con la duración de la exposición. Siendo así, las dosis graduales de una sustancia tóxica que se administran a un organismo suelen generar una respuesta de mayor magnitud conforme se le incrementa la dosis ²⁶.

2.2.3. Cáncer y antineoplásicos

El cáncer se caracteriza por la presencia de células que han sufrido un profundo deterioro en los mecanismos que regulan su diferenciación y proliferación. La pérdida de diferenciación facilita la migración a otros órganos, en los que logran mantener la capacidad de proliferar e invadir ²¹.

El objetivo de la terapia antineoplásica es la eliminación completa de todas las células cancerosas, las que se encuentran cerca del foco tumoral primario mediante cirugía y radioterapia, y las que proliferan en órganos a distancia ²¹.

Estas formas de tratamiento presentan sus riesgos y beneficios. Cabe saber, que no todos los tratamientos farmacológicos aplican a todos los pacientes, lo cual es necesario considerar previamente diversos factores, como la reserva de medula ósea, las funciones renal y hepática, el estado funcional general y los problemas médicos concurrentes. Por otra parte, existen factores menos cuantificables como la evolución natural del tumor, la tolerancia física y emocional del paciente de los efectos adversos, la disposición del paciente a llevar a cabo tratamientos difíciles y potencialmente peligrosos, y los probables beneficios y riesgos relacionados a largo plazo ²⁷.

Además, las células presentes en un tumor no son homogéneas, aunque se hayan generado en un mismo grupo clonal; sin embargo, en el transcurso de la progresión cancerosa, desarrollan características diferentes de carácter bioquímico, morfológico e inmunológico, debido a cambios epigenéticos y mutaciones. Esta heterogeneidad celular se manifestará en diferencias de sensibilidad a los fármacos antineoplásicos, presentando una sensibilidad máxima, hasta una resistencia absoluta ²¹.

Por otra parte, solo las células en periodo proliferativo añaden masa al tumor. Cada célula proliferativa atraviesa un proceso secuencial de crecimiento y división: fases G1, S, G2 y M. Terminada la división celular, la célula puede seguir varios caminos: 1) ingresar en un estado de reposo proliferativo completo y permanente: fase G0; 2) ingresar en el periodo de reposo relativo posmitótico G1, del que puede salir para comenzar de nuevo la fase S, y 3) perder su capacidad reproductora e iniciar una vía de diferenciación. Además, en un tejido normal, la diferenciación se acompaña de una función de especialización que culmina cuando la célula diferenciada sufre apoptosis programada ²¹.

Asimismo, las células tumorales presentan diferencias relativas a la fase del ciclo celular en que se encuentran, por consiguiente, unas pueden encontrarse en fase de proliferación y otras en fase de reposo. Teniendo en cuenta que muchos fármacos antineoplásicos atacan más a las células en división rápida, entonces, gran parte de las células serán resistentes al tratamiento. Sin embargo, una citorreducción inicial al tratamiento (cirugía, radioterapia o fármacos activos con independencia de la fase del ciclo celular) pueden cambiar el equilibrio intratumoral y estimular a las células que se dividan con más rapidez, transformándolas en más sensibles a los fármacos ²¹.

Los mayores desafíos del tratamiento antineoplásico es el ajuste de la dosis a fin de lograr un resultado eficaz terapéutico pero no tóxico ²⁷.

Aunque se realizan los esfuerzos necesarios por prever el surgimiento de complicaciones, los medicamentos antineoplásicos tienen farmacocinéticas y efectos adversos variables en pacientes individuales. En el tratamiento de los efectos adversos, se debe proporcionar un tratamiento de sostén intensivo que

incluye, cuando está indicado, transfusiones de plaquetas, antibióticos y factores de crecimiento hematopoyéticos ²⁷.

Clasificación de medicamentos antineoplásicos

Se clasificaron de acuerdo a su origen y principal mecanismo de acción.

1. Fármacos antimetabolitos

Actúan principalmente en la fase S del ciclo celular, porque interfieren en la síntesis de ADN y ácido ribonucleico (ARN). La mayoría son análogos estructurales de los metabolitos que habitualmente participan en los procesos de crecimiento y división, por ello se pueden incorporar a las moléculas de ADN y ARN, y desde allí emitir falsos mensajes. Otros inhiben enzimas específicas indispensables para la síntesis de compuestos esenciales. Su eficacia comúnmente es máxima cuando la proliferación celular es rápida ²¹.

2. Productos naturales

a) Inhibidores de la mitosis: Desempeñan su acción citotóxica por unirse a la tubulina: interfieren el huso mitótico y generan la detención del ciclo celular en metafase. La acción en los microtúbulos varía: inhiben su formación (alcaloides de la Vinca) o la incrementan y equilibran generándola poca funcional (taxanos)²¹.

b) Inhibidores de topoisomerasas: El irinotecán y el topotecán, derivados del alcaloide camptotecina, inhiben la topoisomerasa I. La II es inhibida por derivados de podofilotoxina (etopósido y tenipósido) y por antibióticos antraciclínicos (daunorrubicina y doxorrubicina) ²¹.

c) Antibióticos: Su origen, estructura y mecanismo de acción son muy diversos. Pueden intercalarse entre cadenas de ADN, inhibir topoisomerasas y alterar la membrana celular. La mayoría no son específicos del ciclo celular ²¹.

d) Enzimas: La L- asparraginasa rompe el aminoácido asparragina, privando de su actividad a la célula que no es capaz de sintetizarlo ²¹.

3. Agentes alquilantes y formadores de enlaces en el ADN

Los agentes alquilantes presentan gran afinidad por el ADN, al que agregan sus radicales altamente reactivos. Además, producen enlaces entre cadenas de ADN y obstaculizan su replicación y la transcripción de ARN. Operan en cualquier fase del ciclo y su toxicidad puede ser diferida en forma de trastornos gonadales y carcinogénesis ²¹.

4. Otros compuestos

Incluyen productos con mecanismos muy diferentes, pero eficaces. Su aplicación es de espectro antitumoral limitado, porque muchos de ellos han sido sintetizados y seleccionado en función de un aspecto biológico concreto de un determinado tumor; por ello su determinada especificidad. Incluyen los anticuerpos monoclonales, los modificadores de la respuesta inmunológica, los inhibidores de proteincinasas, del proteosoma, agentes hormonales o bloqueantes de hormonas, etc ²¹.

2.2.4. Estrés oxidativo y antioxidantes

El estrés oxidativo es una condición que se presenta cuando la producción de especies reactivas de oxígeno sobrepasa la capacidad para contrarrestarlas y eliminarlas, lo cual puede conducir a la oxidación de componentes celulares,

lesión en el ADN, cambios en la expresión génica y activación de vías de transducción de señales ²⁸.

Aparte de presentar como diana de lesión oxidativa al ADN nuclear, otros estudios han encontrado al ADN mitocondrial como objetivo de la oxidación y causa de la disfunción mitocondrial posterior ²⁸.

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas que contienen oxígeno e incluyen radicales libres, como el superóxido y el radical hidróxilo, y no radicales, como el peróxido de hidrógeno ²⁸.

Tener en cuenta, los radicales libres son especies químicas muy reactivas con un electrón desaparejado en la órbita externa de la molécula. Este electrón no emparejado ocasiona que los radicales libres sean inestables y muy reactivos, generando su reacción inespecífica con moléculas cercanas mediante la sustracción de un electrón, oxidándolas y perdiendo de esta manera su función específica en la célula ²⁸.

Estas especies reactivas son productos de causas endógenas como la respiración mitocondrial y la generación celular de energía y causas exógenas como lesión celular, lesión química y por radiación, toxicidad por oxígeno y otros gases, destrucción de agentes microbianos y lesión tisular causada por inflamación ²⁸.

Principales especies reactivas de oxígeno

1. Anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$)

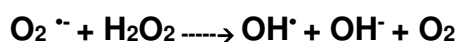
Es el radical más numeroso a nivel celular. Principalmente se genera en la cadena de transporte de electrones y en la fagocitosis, en este último como defensa bactericida ²⁹.

Además, dentro de las sustancias que se oxidan y conllevan a la generación de esta especie reactiva son; hemoglobina, mioglobina y catecolaminas. Asimismo, enzimas como NADPH oxidasa y xantina oxidasa generan radicales superóxido²⁹.

2. Radical hidroxilo (OH[•])

Presenta una alta reactividad, esto es inversamente proporcional a su vida media, indicando una vida media bastante corta, a causa de su reacción rápida e inespecífica con los blancos celulares más cercanos (carbohidratos, ADN, lípidos y proteínas) ²⁹.

La generación de este radical a nivel celular se da por distintos mecanismos como la radiolisis del agua que contiene la célula cuando esta es expuesta a radiaciones ionizantes como los rayos X y los rayos gamma. Asimismo, al reaccionar el radical superóxido con el peróxido de hidrogeno se produce el radical hidroxilo a través de la reacción de Haber-Weiss ²⁹.



Por otra parte, la formación del radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrogeno, puede llegar a ser catalizada por la presencia de iones de metales de transición a través de la reacción de Fenton ²⁹.



Por lo tanto, existen elementos que favorecen la formación de radicales libres como los iones de metales de transición, debido a que cambian de estado de valencia van perdiendo o ganando electrones, siendo el hierro y el cobre los más abundantes en el organismo. Aun cuando los iones hierro que se encuentran en la transferrina y lactoferrina en presencia de pH fisiológico no

participan de la producción de este radical libre, el hierro que se encuentra en la ferritina puede ser desplazado por moléculas reductoras como el superóxido o el ascorbato y catalizar la formación del radical hidroxilo ²⁹.

3. Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)

No es un radical libre, pero es una forma reactiva muy importante, debido a que posee la capacidad de generar el radical hidroxilo cuando se encuentra en presencia de metales como el hierro ²⁹.

Es formado principalmente en la matriz mitocondrial, al realizar la reducción parcial de oxígeno o en la dismutación del radical superóxido por la enzima superóxido dismutasa. Además, se genera también en otros organelos celulares como peroxisoma, citosol y retículo endoplásmico ²⁹.

4. Oxígeno singlete (O_2^1)

Es producido en diferentes procesos como la fagocitosis, inducción luminosa, reacciones catalizadas por peroxidasas, entre otras. Posee una vida media corta de aproximadamente 0,5 microsegundos, caracterizándose porque en su estado molecular no presenta restricción en la transferencia de electrones, por ello es altamente reactivo ²⁹.

Además, es capaz de modificar diferentes biomoléculas como el ADN y causar daños en las proteínas a través de la oxidación de ciertos grupos esenciales de aminoácidos. De igual manera, da inicio a la lipoperoxidación generando radicales como el alcoxilo ($RO\bullet$) y peroxilo ($ROO\bullet$) ²⁹.

Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas naturales y sintéticas que inhiben las reacciones de las especies reactivas de oxígeno o impiden su formación descontrolada ²⁸.

Los antioxidantes abarcan compuestos enzimáticos y no enzimáticos. Las enzimas con acción antioxidante se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la tioreductasa. Los antioxidantes no enzimáticos abarcan carotenos, tocoferoles, ácido ascórbico y flavonoides, asimismo, oligoelementos como selenio y zinc ²⁸.

2.2.5. Inflamación y antiinflamatorios

La inflamación es la reacción de los tejidos vascularizados ante la lesión o la muerte celular. Se caracteriza por la producción de mediadores inflamatorios y el desplazamiento de líquido y leucocitos del sistema vascular a los tejidos extravasculares ³⁰.

La inflamación puede ser aguda o crónica. La inflamación aguda es la respuesta de adaptación desencadenada por estímulos y situaciones nocivas, como la infección y la lesión tisular, y es relativamente corta, desde unos cuantos minutos hasta varios días. Se caracteriza por la exudación de líquido y proteínas plasmáticas, y por la emigración de leucocitos sobre todo neutrófilos. La inflamación crónica es más prolongada, con duración de días a años, y se acompaña de la proliferación de vasos sanguíneos, necrosis tisular y fibrosis (cicatrización) ³⁰.

La inflamación aguda y la crónica pueden coexistir, con episodios de inflamación aguda intercalado con la crónica ³⁰.

Células de la inflamación

Muchas células y componentes tisulares participan en el proceso inflamatorio, entre otras las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, plaquetas y leucocitos circulantes, las células del tejido conectivo (mastocitos, fibroblastos, macrófagos tisulares) y los componentes de la matriz extracelular. Los principales leucocitos en la inflamación aguda son los neutrófilos, mientras que en la inflamación crónica predominan los macrófagos, los linfocitos, las células plasmáticas, las células plasmáticas, los eosinófilos y los mastocitos ³⁰.

Inflamación aguda

La inflamación aguda es la respuesta temprana de los tejidos locales y sus vasos sanguíneos a la lesión, cuya propósito principal es eliminar el agente nocivo y limitar la extensión del daño tisular. Además, son diversos los estímulos que desencadenan la inflamación aguda, como traumatismos contusos o penetrantes, reacciones inmunitarias, infecciones, agentes físicos o químicos y necrosis tisular por distinta causa ³⁰.

Etapas vascular y celular

La inflamación aguda presenta dos etapas: la etapa vascular, caracterizada por el flujo sanguíneo incrementado (vasodilatación) y cambios estructurales (permeabilidad vascular aumentada) lo que genera la salida de proteínas plasmáticas de la circulación. Asimismo, la etapa celular, que implica el desplazamiento de leucocitos (generalmente neutrófilos) de la microcirculación y su aglomeración en la zona infectada o lesionada ³⁰.

Mediadores inflamatorios

Los mediadores inflamatorios provienen del plasma o se generan en las células del punto de inflamación. Así tenemos a los siguientes: Mediadores derivados del plasma, los cuales se sintetizan en el hígado e incluyen a las proteínas de fase aguda, factores de coagulación y proteínas del complemento. Tener en cuenta, que estos mediadores se encuentran en el plasma en forma de precursores que deben activarse a través de una serie de procesos proteolíticos para obtener sus propiedades biológicas. Mediadores derivados de células, están atrapados en gránulos intracelulares que deben secretarse, tal como la histamina de los mastocitos, o sintetizarse como productos nuevos, tales como las citosinas, en reacción a un estímulo ³⁰.

Los mediadores pueden ejercer su acción en una o varias células diana, tener efectos diferentes en distintos tipos de células o presentar objetivos diversos ³⁰.

Manifestaciones locales

Las manifestaciones locales de la inflamación aguda son variables, desde hinchazón leve y enrojecimiento hasta el desarrollo de ulceración o absceso, dependiendo de la gravedad, sitio afectado y causa específica ³⁰.

Además, lo característico de la respuesta inflamatoria aguda es la producción de exudados, los cuales varían en el contenido de proteínas plasmáticas, tipo de líquido y presencia o ausencia de células ³⁰.

Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

La capacidad de los AINEs para reducir la inflamación es variable, generalmente son más eficaces frente a inflamaciones agudas que crónicas ³¹.

Los AINEs al inhibir la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, disminuyen su actividad sensibilizadora de las terminaciones nerviosas nociceptoras, también su actividad quimiotáctica y vasodilatadora. De esta manera, interfieren en uno de los mecanismos iniciales de la inflamación ³¹.

Por otra parte, algunos AINEs inhiben el aumento de la expresión de determinadas moléculas de adhesión celular (p. ej., selectina E, ICAM-1 y VCAM-1) en células endoteliales estimuladas ³¹.

Antiinflamatorios esteroideos (Glucocorticoides)

Los glucocorticoides desempeñan una potente acción antiinflamatoria, cualquiera sea la causa (infecciosa, química, física o inmunológica), llegando a inhibir las manifestaciones inmediata y tardías de la inflamación ³².

De igual modo, disminuyen la dilatación vascular, reducen la transudación líquida y la formación de edema, disminuyen el exudado celular y reducen el depósito de fibrina alrededor del área inflamada ³².

2.2.6. Flavonoides y propiedades farmacológicas

Los flavonoides presentan una estructura general C6-C3-C6, en el cual los dos anillos aromáticos llamados A y B, de naturaleza fenólica, están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C ^{5,33}.

Mientras que la mayoría de flavonoides tienen su anillo B unido a la posición C2 del anillo C, algunos flavonoides como isoflavonas y neoflavonoides, presenta un anillo B que conectado en la posición C3 y C4 del anillo C, respectivamente³³.

Las chalconas, aunque carecen del anillo C heterocíclico, todavía se clasifican como miembros de la familia de los flavonoides ³³.

Por otra parte, los flavonoides pueden ser divididos en diferentes subgrupos como antocianinas, flavan-3-oles, flavonas, flavanonas y flavonoles ³³. Además, cada una de las clases de flavonoides suelen encontrarse bajo la forma de glicósidos con una a tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones ^{5,33}.

Las características generales de estos compuestos son su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados. Asimismo, uno de los métodos más usuales para analizar la posible estructura del flavonoide es la absorción UV-Vis, donde esta técnica es usada para identificar el posible tipo de flavonoide y grupos sustituidos ^{5, 33}.

Los espectros de flavonoides se determinan usualmente en solución alcohólica. Además, el espectro generalmente consiste de dos rangos máximos de absorción entre 240 a 285 nm (Banda II) y 300 a 550 nm (Banda I). En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestran los rangos de los valores de absorción para la banda I y II de los diferentes tipos de flavonoides ⁵.

Tabla 1. Valores de absorción para las bandas I y II de los diferentes tipos de flavonoides.

Banda II, nm	Banda I, nm	Tipo de flavonoide
230-270	340-390	Chalconas
230-270	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas, antocianinas
250-280	310-350	Flavonas
250-280	330-360	Flavonoles (3-OH substituido)
250-280	350-385	Flavonoles (3-OH libre)
245-275	310-330	Isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxi)
275-295	300-330	Isoflavonas, dihidroflavonoles

Fuente: Lock O.⁵

Propiedades farmacológicas

Los flavonoides presentan un amplio espectro farmacológico como actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, antibacteriana, antitrombogénica, antiaterogénica, antitumoral, entre otros ³⁴. Además, presentan efectos preventivos en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedad de Alzheimer y obesidad ^{35, 36}.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Tipo de investigación

La investigación es de tipo experimental, analítico, prospectivo en función a su evaluación en el tiempo y transversal en función a una sola medición en el tiempo.

3.2 Diseño de la investigación: Experimental, prospectivo y transversal

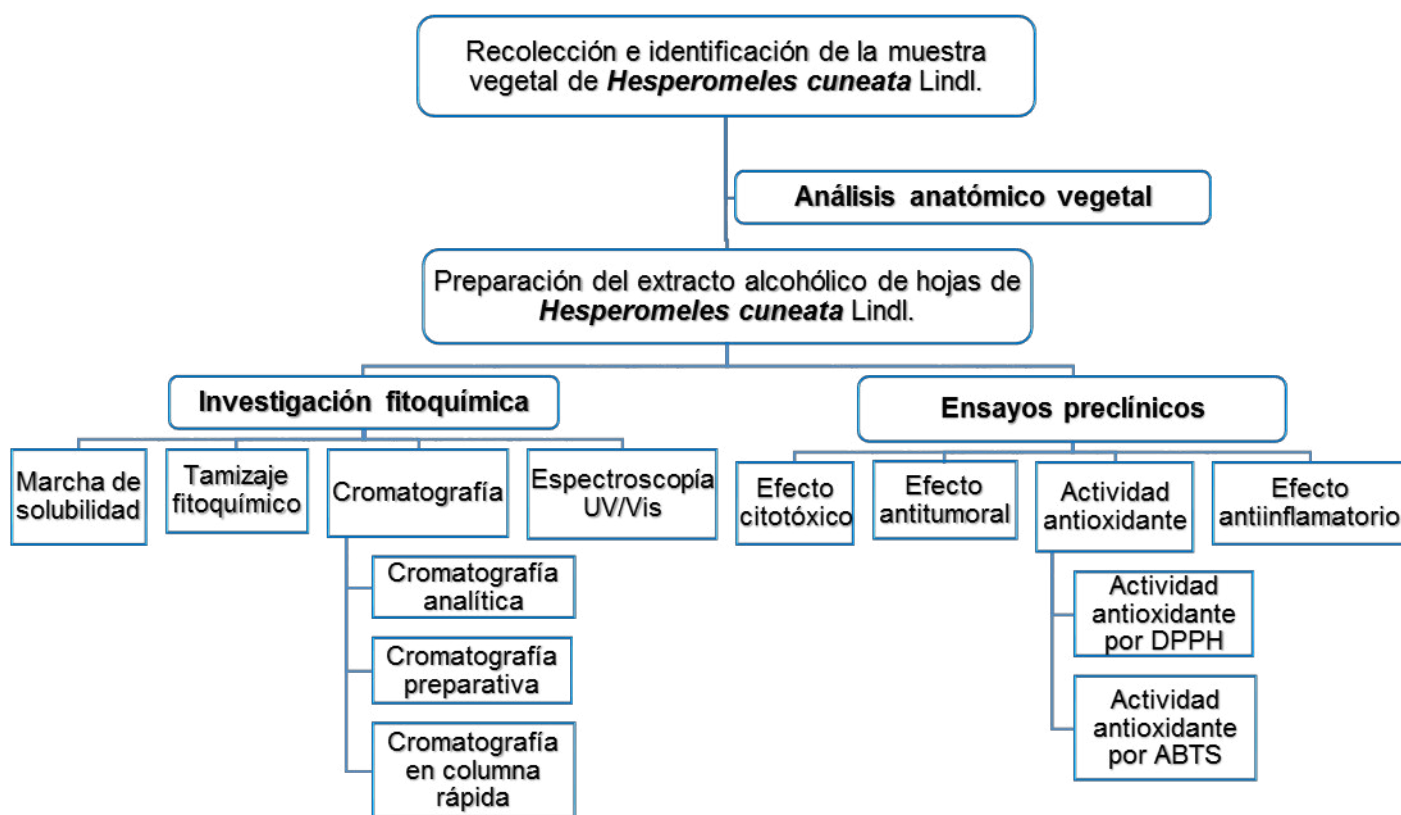


Figura 2. Flujograma de investigación.

Fuente: Propia.

3.3. Materiales

3.3.1. Materiales, equipos y reactivos

1. Materiales de laboratorio

Beaker Pyrex de 100 mL, 250 mL y 500 mL; embudo Büchner; matraz de Kitasato; bomba de vacío; micropipeta 10-100 µL , 20-200 µL y 100-1000 µL; placas de cultivo de tejidos con fondo plano de poliestireno de 96 pocillos; pipeta multicanal; cuba cromatográfica ; calibrador digital; sonda intragástrica; jeringas descartables de 3 y 5 mL; agujas descartables de N° 21 G y 26 G.

2. Equipos

Estufa de secado Memmert, microscopio óptico Olympus, lámpara de luz UV, espectrofotómetro UV/Vis Thermo Scientific GENESYS 10 S , agitador magnético, estereoscopio Belnet, microscopio óptico Zeiss, estufa HV OVENS con aire circulante, incubadora bioquímica Zticheng ZSD-1090, microscopio invertido TMS NIKON y lector Multiwell de microplacas PerkinElmer.

3. Reactivos

A. Reactivos

Azul de toluidina, reactivo de FeCl₃, reactivo de Dragendorff, reactivo de Shinoda, reactivo de Bornträger, reactivo de Molisch, reactivo de Baljet, silicagel 60-G, ácido sulfúrico concentrado, amoniaco, silicagel para cromatografía en columna, dimetilsulfoxido, sulforodamida B, ácido tricloroacético, solución base Tris 10 mM pH 10.5, reactivo ABTS^{•+}, reactivo DPPH y carragenina lambda

B. Solventes

Etanol, agua destilada, n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol y metanol

C. Estándares

Rutina, hesperidina y trolox

3.3.2. Materiales biológicos

a) Material vegetal

Formado por las hojas de la especie *Hesperomeles cuneata* Lindl.

b) Material animal

- ❖ Ratas albinas hembras cepa Holtzman de 2,5 meses, 200-250 g, las cuales fueron adquiridas en el bioterio del Centro Nacional de Productos Biológicos-Instituto Nacional de Salud, quien nos emitió el certificado sanitario respectivo.

(Anexo II)

Fueron sometidas a un proceso de aclimatación por un periodo de 7 días antes de realizar la prueba, a una temperatura controlada de 20 ± 2 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12-12 h y humedad de 30 a 65 %. La alimentación consistió en alimento para roedores y *agua ad libitum*.

- ❖ Erizos de mar (*Tetrapygus niger*) procedentes de las costas marinas de Lima.

c) Material celular

- ❖ Línea celular de fibroblastos normales de embrión de ratón BALB/c 3T3
- ❖ Línea celular de melanoma amelanótico humano M-14
- ❖ Línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29

3.4. Metodología

3.4.1. Recolección de la planta

La planta en estudio fue recolectada en la provincia de Santiago de Chuco, región La Libertad a 3 500 metros de altitud.

3.4.2. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la especie se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. **(Anexo I)**

3.4.3. Acondicionamiento de la muestra

Se acondicionó la muestra y se seleccionaron las hojas, en buen estado, libres de deterioro y/o hongos.

3.4.4. Secado y reducción de tamaño

Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente. Luego, se secaron en estufa de aire circulante a 40 °C y finalmente se procedió a la reducción del tamaño de partícula ⁵.

3.4.5. Elaboración del extracto

El extracto se elaboró mediante maceración metanólica con agitación periódica en un intervalo de siete días. Posteriormente, la solución fue filtrada por gravedad y secada en estufa de aire circulante a 40°C ⁵.

3.4.6. Análisis anatómico vegetal

Ambiente de trabajo: Laboratorio de botánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Técnica: Tinción histológica

Procedimiento: Se procedió a realizar los cortes histológicos de la hoja a mano alzada en forma transversal y se observaron en microscopio. Las secciones transversales fueron aclaradas con hipoclorito de sodio 50%. Luego, fueron enjuagadas con agua destilada y lavadas con alcohol de diferente graduación. Finalmente, se realizó el teñido y montaje respectivo ³⁷⁻⁴⁰.

3.4.7. Investigación fitoquímica

Ambiente de trabajo: Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

3.4.7.1. Técnica: Marcha de solubilidad

Procedimiento: El extracto alcohólico seco (5 mg) se trató con solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol, etanol, metanol y agua ⁵.

3.4.7.2. Técnica: Tamizaje fitoquímico

Procedimiento: Se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto, utilizando los reactivos de FeCl_3 , gelatina, reactivo de Shinoda, reactivo de ninhidrina, reactivo de Dragendorff, reactivo de Mayer, reactivo de Molisch, entre otros ⁵.

3.4.7.3. Técnicas cromatográficas

Procedimiento: Se realizó cromatografía en capa fina analítica y luego preparativa, se sembró la muestra y desarrolló con el sistema de solventes cloroformo: metanol (2:1), revelándose la cromatoplaqueta a la lámpara de luz UV-Vis a 254 nm y 365 nm ⁵.

Después, se realizó el análisis de los componentes mediante reveladores cromogénicos utilizando los reactivos de FeCl_3 , Dragendorff, H_2SO_4 , entre otros.

Además, se realizó un fraccionamiento del extracto mediante cromatografía en columna rápida, donde se trató con solventes de polaridad creciente: cloroformo, metanol y agua ⁵.

3.4.7.4. Espectroscopía UV/Vis

Procedimiento: Posteriormente de realizar la cromatografía en capa fina preparativa se procedió a la desorción de las manchas correspondientes a los analitos presentes. Finalmente, fueron leídos en el espectrofotómetro UV/Vis Thermos Scientific GENESYS 10S y se proponen las estructuras químicas de acuerdo a los descrito y publicado por Mabry, *et al.*⁴¹ y Lock O ⁵.

3.4.8. Ensayos preclínicos

3.4.8.1. Determinación del efecto citotóxico

Ambiente de trabajo: Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Técnica: Bioensayo de citotoxicidad en embriones de erizo de mar

Procedimiento: Se preparó distintas concentraciones del extracto y un control con agua de mar filtrada (1 mL) en viales de 10 mL. Luego, se extrajeron los gametos masculino (color crema amarillento) y femenino (color granate), las gónadas femeninas se sacuden en el agua de mar y los ovocitos caen en dicha agua filtrada y las gónadas masculinas se colocaron en una placa Petri sin agua.

Después de lavar 2 veces el agua de mar con ovocitos (por decantación), se añadió 3 gotas del esperma al beaker que contiene los ovocitos en agua de mar filtrada y se agitó cuidadosamente. Se observó al microscopio para comprobar la fecundación *in vitro*. A continuación, a las distintas concentraciones del extracto y control colocados previamente en viales de 10 mL, se le añadieron 2 mL de agua de mar con huevos fecundados. Todas las muestras se colocaron en una incubadora a 15°C sobre una plataforma de agitación con oxigenación permanente. Todo se realizó por triplicado. Finalmente, se realizaron las observaciones correspondientes a las 48 horas ^{22, 42, 43}.

3.4.8.2. Determinación del efecto antitumoral

Ambiente de trabajo: Laboratorios de Investigación y Desarrollo “Abraham Vaisberg Wolach” de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Técnica: Bioensayo de citotoxicidad diferencial mediante sulforodamida B (SRB)

Procedimiento: El ensayo de citotoxicidad se realizó en diferentes líneas celulares tumorales usando el método de sulforodamida B (SRB), el cual se utiliza para la determinación de la densidad celular, basado en la medición de las proteínas celulares. Después de un periodo de incubación, las monocapas de células fueron fijadas con ácido tricloroacético 10% (p/v), se tiñeron con una solución de SRB durante 20 minutos, tras lo cual el exceso de colorante se eliminó lavando varias veces con ácido acético 1% (v/v). El colorante unido a las proteínas se disolvió en solución de base Tris 10 mM pH 10,5 y luego la solución fue leída a 510 nm utilizando un lector de microplacas ^{23, 24,44}.

Análisis estadístico: Se utilizó el análisis de regresión lineal para hallar la concentración que inhibe en un 50% el crecimiento celular (GI50). Además, se determinó el índice de selectividad a través de la relación GI50 (línea control)/ GI50 (línea tumoral).

3.4.8.3. Determinación de la actividad antioxidante

Ambiente de trabajo: Instituto de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

a) Técnica: Determinación de la actividad antioxidante empleando el radical ABTS^{•+}

Procedimiento: Se preparó el radical ABTS^{•+} 16 horas antes del inicio del ensayo a temperatura ambiente y se dejó en oscuridad. Luego se realizó una dilución a 734 nm hasta obtener una absorbancia de $0,7 \pm 0,02$.

Se prepararon distintas concentraciones del extracto y un control, el cual contenía el solvente del extracto. Después, los tubos de reacción fueron preparados con 20 μ L de las sustancias anteriores y 980 μ L de ABTS^{•+} y colocados a oscuridad por un periodo de 7 minutos. Finalmente se realizó la lectura a 734 nm a temperatura ambiente ^{45, 46}.

Además, se prepararon distintas concentraciones del estándar Trolox. Posteriormente, los tubos de reacción fueron preparados con 20 μ L del estándar y 980 μ L de ABTS^{•+} y colocados a oscuridad por un periodo de 7 minutos. Finalmente se realizó la lectura a 734 nm a temperatura ambiente ^{45, 46}.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado en tres ensayos independientes. Los resultados se expresaron en IC50 y TEAC-ABTS ^{45, 46}.

b) Técnica: Determinación de la actividad antioxidante empleando el radical DPPH

Procedimiento: Se preparó la solución del radical DPPH 2% en etanol y se mantuvo en frío y oscuridad. Luego se realizó una dilución a 517 nm hasta obtener una absorbancia de $0,6 \pm 0,02$.

Se prepararon distintas concentraciones del extracto y un control, el cual contenía el solvente del extracto. Después, los tubos de reacción fueron preparados con 0,4 mL de las sustancias anteriores y 0,8 mL de DPPH y colocados a oscuridad por un periodo de 30 minutos. Finalmente se realizó la lectura a 517 nm a temperatura ambiente ^{46, 47}.

Además, se prepararon distintas concentraciones del estándar Trolox. Después, los tubos de reacción fueron preparados con 0,4 mL del estándar y 0,8 mL de DPPH y colocados a oscuridad por un periodo de 30 minutos. Finalmente se realizó la lectura a 517 nm a temperatura ambiente ^{46, 47}.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado en tres ensayos independientes. Los resultados se expresaron en IC50 y TEAC-DPPH ^{46, 47}.

Análisis estadístico: Se utilizará el análisis de regresión lineal para hallar la concentración que inhibe en un 50% el radical utilizado (IC50).

3.4.8.4. Determinación del efecto antiinflamatorio

Ambiente de trabajo: Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Técnica: Edema subplantar inducida por carragenina

Procedimiento: Una vez aclimatados las ratas albinas hembras cepa Holtzman de 2.5 meses por una semana, se procedió a someterlos a ayuno y agua *ad libitum* 12 horas antes del inicio del ensayo. Posteriormente, fueron distribuidos en siete grupos de seis ratas y tratadas vía oral de la siguiente manera: A) Control negativo: Suero fisiológico; B) Control positivo 1: Ibuprofeno 120 mg/kg; C) Control positivo 2: Dexametasona 2 mg/kg y, D) Tratamientos de extracto (25 mg/kg, 100 mg/kg, 250 mg/kg y 500 mg/kg). Después se inyectó 0,1 mL de carragenina lambda al 1% en la aponeurosis subplantar de la pata derecha. La medición de la inflamación del edema subplantar fue mediante calibrador digital, cuyos resultados fueron expresados por la variación del diámetro de la pata, antes y 1, 3, 4, 5, 6 y 7 horas después de la inducción de la inflamación ^{48, 49}.

El manejo de los animales de laboratorio se hizo cumpliendo los tópicos para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de acuerdo al Institute for Laboratory Animal Research ⁵⁰, y en respeto a la normativa vigente de la Ley de Protección y Bienestar Animal (Ley N°30407) ⁵¹, recibiendo la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con el registro Nro. 001-CE-UDI-FFB-2018 y emitido el 02 de mayo del 2018. **(Anexo III)**

Análisis estadístico: Los datos obtenidos se expresaron en promedios y desviación estándar, en un intervalo de confianza del 95 %. y considerando valores significativos una $p < 0,05$.Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) en el programa estadístico SPSS versión 23 - 2014 para determinar la significancia estadística entre los grupos.

Además, para el cálculo del porcentaje de inhibición de la reacción inflamatoria inducida por carragenina se empleó la siguiente formula:

$$\text{EAI: } [(D/D_0 - d/d_0) / D/D_0] * 100$$

EAI: Eficiencia antiinflamatoria

D/D₀: Incremento del diámetro del blanco, referida al diámetro inicial (D₀)

d/d₀: Incremento del diámetro inflamado tratado con un agente antiinflamatorio, referida al diámetro inicial (d₀)

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis anatómico vegetal

La hoja mostró un tipo mesomórfico, donde la estructura bifacial presentó parénquima lagunar en dirección a la cara abaxial y parénquima en empalizada en dirección a la cara adaxial. (Figura 3)

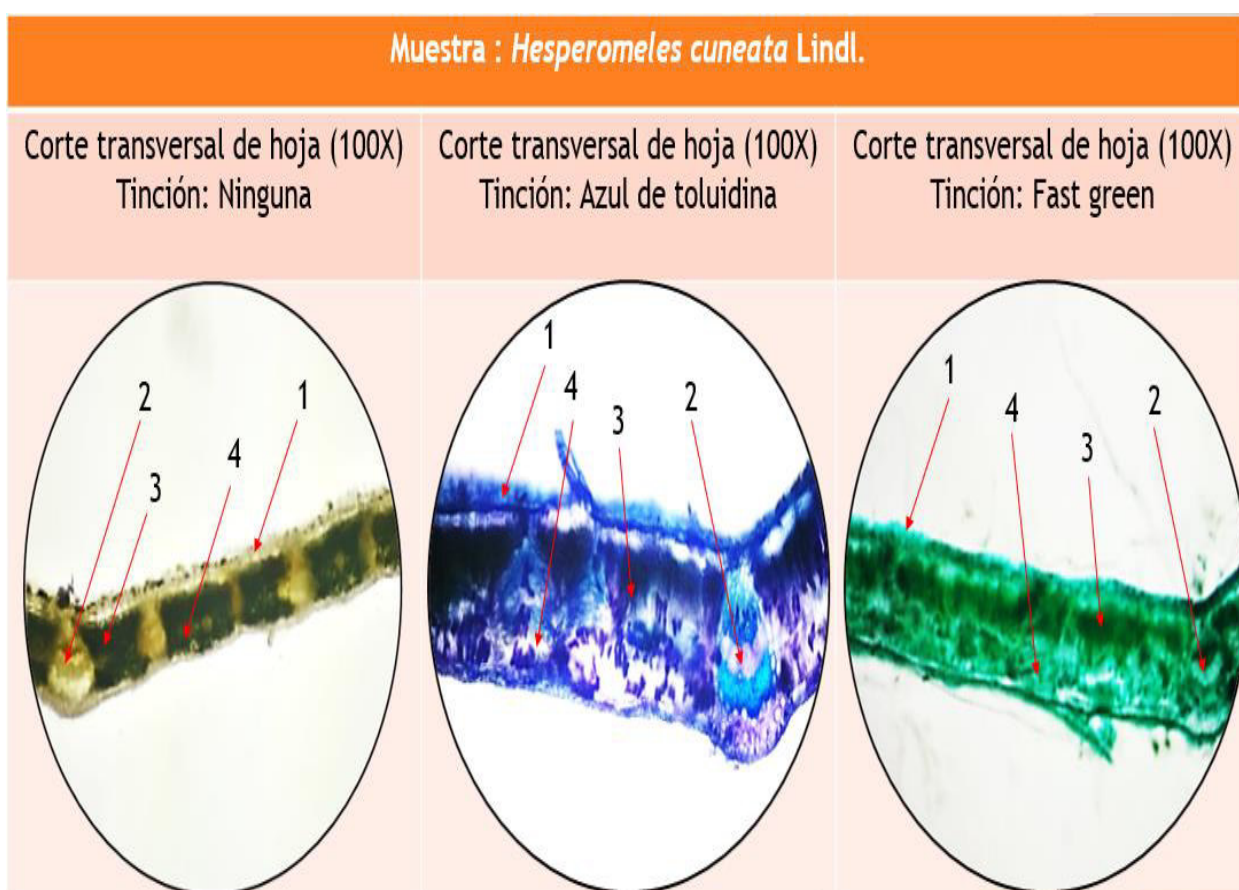


Figura 3. Análisis anatómico vegetal. 1) Cutícula; 2) Haces vasculares centrales; 3) Parénquima en empalizada; 4) Parénquima esponjoso.

Fuente: Propia.

4.2. Investigación fitoquímica

4.2.1. Marcha de solubilidad

En la marcha de solubilidad, se detectó que el extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. fue soluble con solventes orgánicos de polaridad creciente. (Tabla 2)

Tabla 2. Marcha de solubilidad del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl.

Solvente	Resultado
n-Hexano	+
Cloroformo	++
Acetato de etilo	+
Butanol	+
Etanol	++
Metanol	+++
Agua	+

Leyenda: (+++) Soluble; (++) Parcialmente soluble; (+) Poco soluble; (-) Insoluble

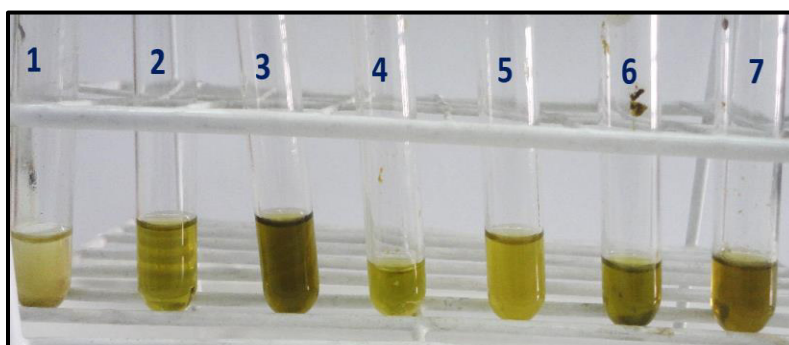


Figura 4. Marcha de solubilidad. 1) Agua; 2) Metanol; 3) Etanol; 4) Acetato de etilo; 5) Butanol; 6) n-Hexano; 7) Cloroformo.

Fuente: Propia.

4.2.2. Tamizaje fitoquímico

Se evidenció presencia de taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, entre otros y ausencia de aminoácidos. (Tabla 3)

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl.

Metabolito	Reactivo	Resultado
Taninos	Gelatina	+++
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	+++
Aminoácidos	Ninhidrina	-
Alcaloides	Dragendorff	+++
	Mayer	+++
Flavonoides	Shinoda	++++
Antraquinonas y naftoquinonas	Bornträger	+++
Glicósidos	Molisch	+++
Aldehidos	Fehling	+++
Esteroides y terpenoides	Liebermann-Burchard	+++
Lactonas insaturadas	Baljet	+++
Saponinas	Test afrosimétrico	+++

Leyenda: (++++) Abundante ;(+++) Bastante; (++) Regular; (+) Poco; (-) Ausente

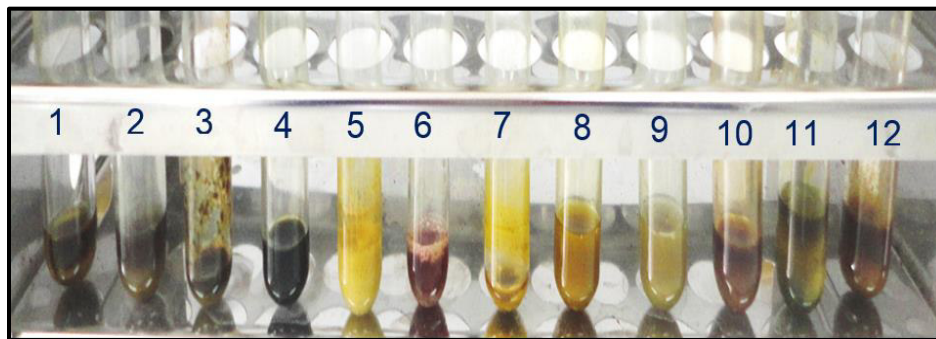


Figura 5. Tamizaje fitoquímico. 1) Blanco; 2) Molisch; 3) Fehling; 4) FeCl₃; 5) Gelatina; 6) Shinoda; 7) Ninhidrina; 8) Dragendorff; 9) Mayer; 10) Bornträger; 11) Liebermann-Burchard; 12) Baljet . **Fuente:** Propia.

4.2.3. Técnicas cromatográficas

4.2.3.1. Cromatografía en capa fina analítica

En la cromatografía en capa fina analítica bajo el sistema de solventes Cloroformo: Metanol (2:1) y revelado en luz UV 254 nm y 365 nm se encontró posibles componentes representados por las siguientes manchas. (Figura 6)






Luz UV 254 nm. 1) Rutina; 2) Extracto; 3) Hesperidina	Luz UV 365 nm. 1) Rutina; 2) Extracto; 3) Hesperidina
 <div><div>1</div><div>2</div><div>2</div><div>3</div></div> Fuente: Propia.	 <div><div>1</div><div>2</div><div>2</div><div>3</div></div> Fuente: Propia.

Figura 6. Cromatografía en capa fina analítica del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. frente a estándares y revelado en luz UV 254 y 365 nm.

En la cromatografía en capa fina analítica bajo el sistema de solventes Cloroformo: Metanol (2:1) y utilizando reveladores cromogénicos se encontró las siguientes manchas correspondientes a posibles componentes de alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos. (Figura 7)

Extracto en luz UV 254 nm.	Extracto en luz UV 365 nm.
 <p data-bbox="573 1031 802 1066">Fuente: Propia.</p>	 <p data-bbox="1154 1047 1383 1083">Fuente: Propia.</p>
Extracto + Reveladores: 1) Dragendorff; 2) H ₂ SO ₄ ; 3) Visible; 4) NH ₄ ; 5) FeCl ₃	
 <div data-bbox="634 1808 982 1860"> <div>1</div> <div>2</div> <div>3</div> <div>4</div> <div>5</div> </div> <p data-bbox="992 1835 1221 1871">Fuente: Propia.</p>	



Revelado en luz UV 254 nm	Revelado en luz UV 365 nm
 <p>Fuente: Propia.</p>	 <p>Fuente: Propia.</p>

Figura 7. Cromatografía en capa fina analítica del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y utilizando reveladores cromogénicos.

4.2.3.2. Cromatografía en capa fina preparativa

En la cromatografía en capa fina preparativa bajo el sistema de solventes Cloroformo: Metanol (2:1) se encontró posibles componentes representados por las siguientes 15 manchas. (Figura 8)

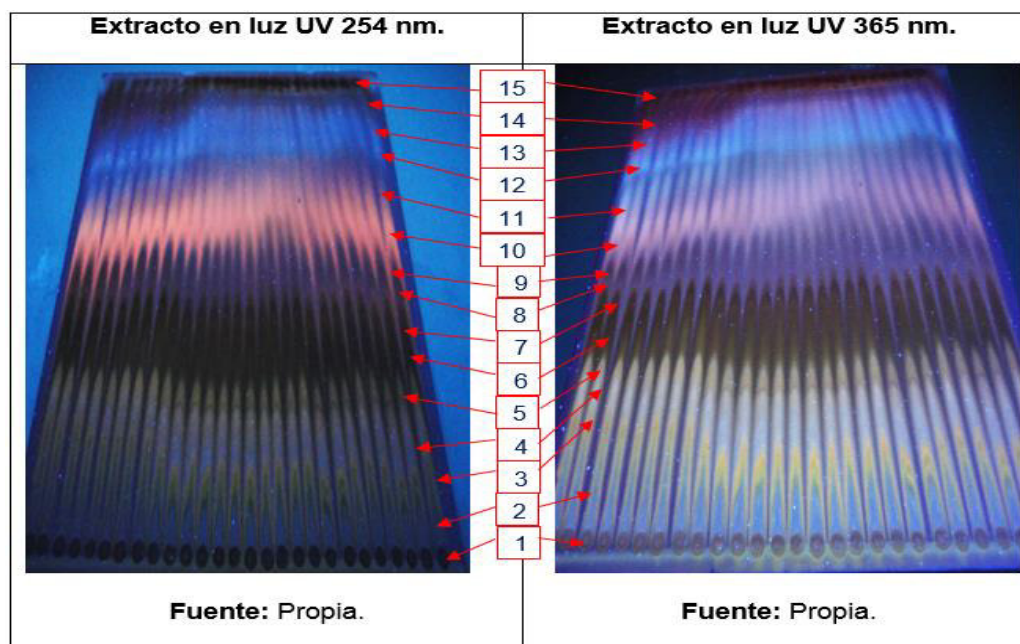


Figura 8. Cromatografía en capa fina preparativa del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y revelado en luz UV 254 y 365 nm.

4.2.3.3. Cromatografía en columna rápida

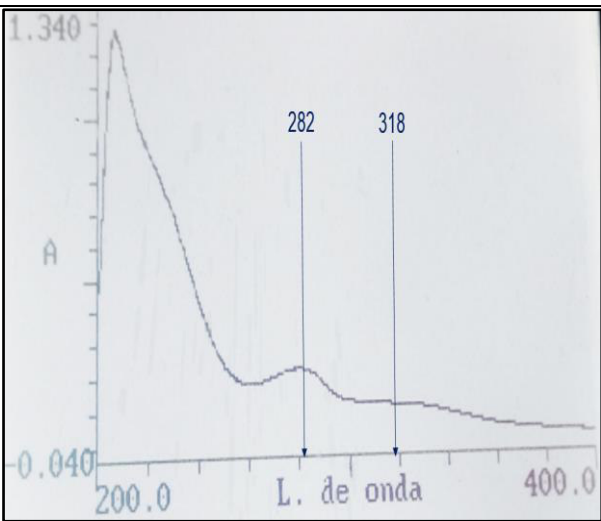
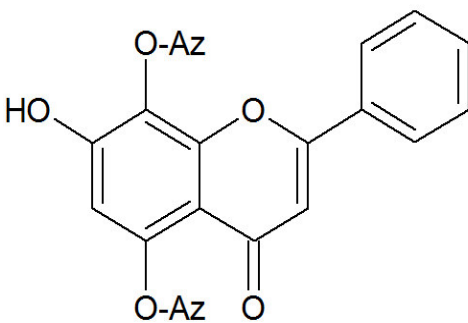
El extracto se trató con solventes de polaridad creciente: Cloroformo, metanol y agua, obteniéndose las siguientes fracciones. (Tabla 4)

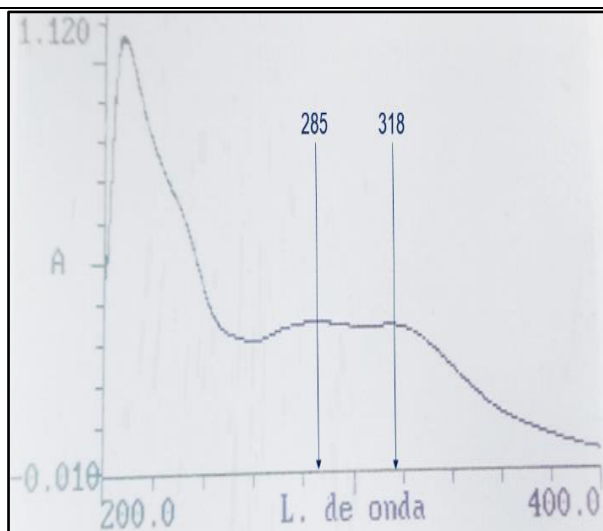
Tabla 4. Fraccionamiento de 8 g del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. al realizar cromatografía en columna rápida

Fraccionamiento del extracto	Peso (g)
Fracción 1 (F1) – Cloroformo	1,04
Fracción 2 (F2) – Metanol	4,34
Fracción 3 (F3) – Agua	1,27

4.2.4. Espectroscopía UV/Vis

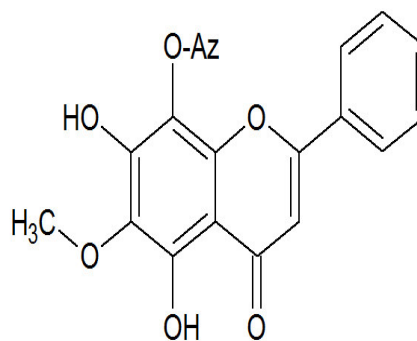
Al realizar el análisis de los respectivos componentes del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. en el espectrofotómetro UV/Vis, se propusieron las siguientes estructuras de naturaleza fenólica. (Figura 9)

1) Espectro UV/Vis	2) Estructura propuesta
 <p>Fuente: Propia.</p>	<p>Componente 1 $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtoH}}$ 282,318 nm</p>  <p>5,8-O-Diazúcar-7-hidroxiavona</p> <p>Fuente: Propia.</p>



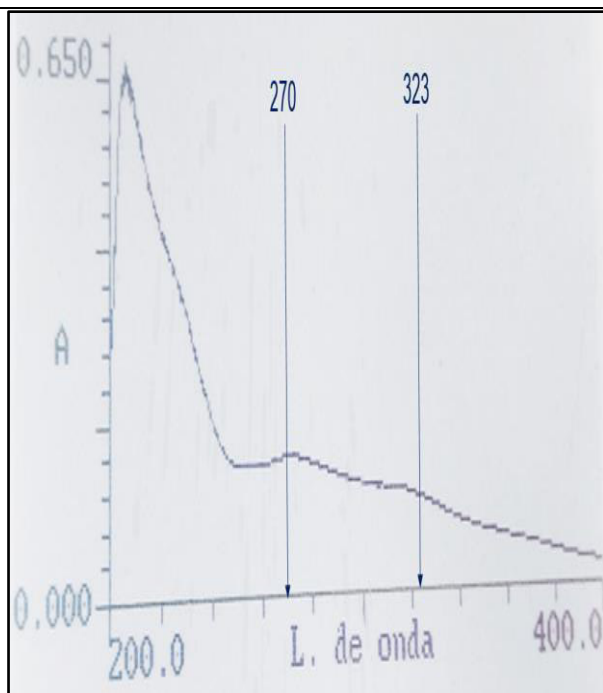
Fuente: Propia.

Componente 2 $\lambda_{\text{EtoH máx}}$ 285,318 nm



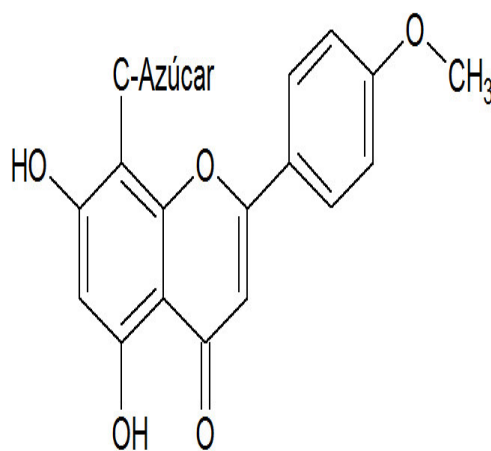
8-O-Azúcar-5,7-dihidroxi- 6-metoxiflavona

Fuente: Propia.



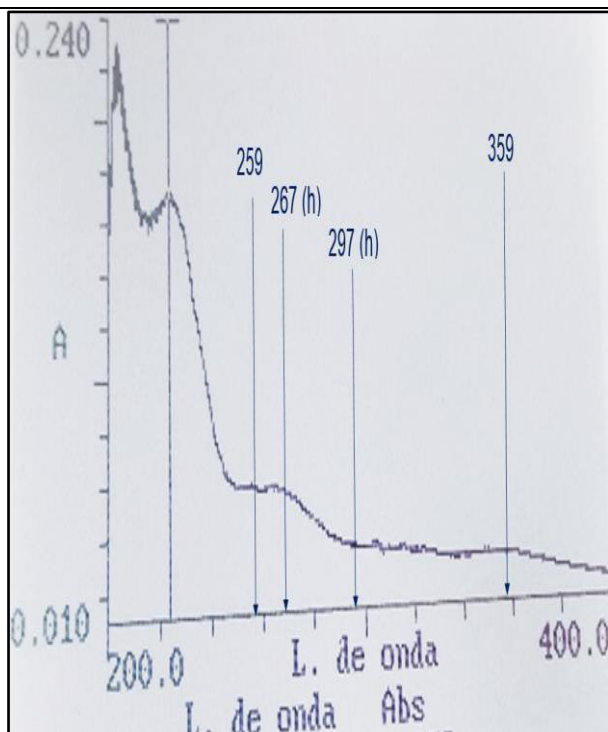
Fuente: Propia.

Componente 3 $\lambda_{\text{EtoH máx}}$ 270,323 nm



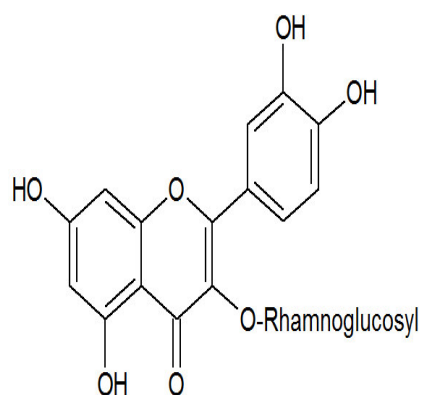
8-C-Azúcar-5,7-dihidroxi- 4'-metoxiflavona

Fuente: Propia.



Fuente: Propia.

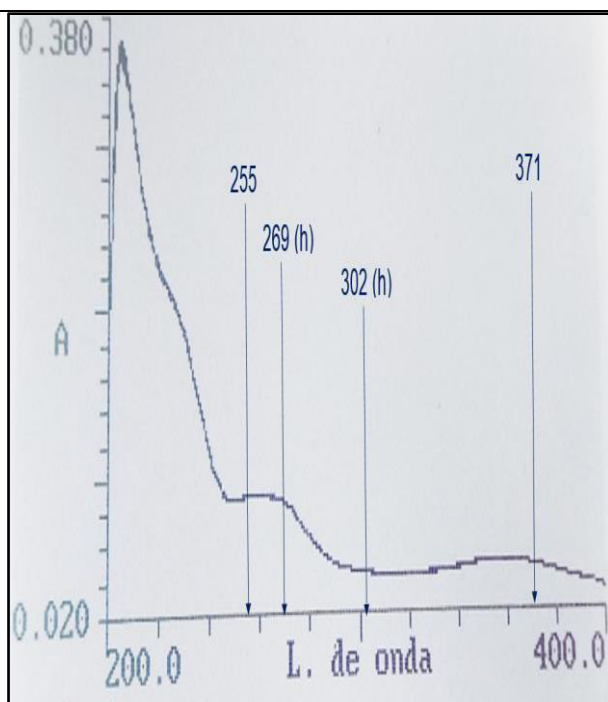
Componente 5 $\lambda_{\text{EtoH}}^{\text{máx}}$ 259, 267(h),
297(h), 359 nm



3',4',5,7- tetrahidroxi-3-O-Rutinósido (RUTINA)

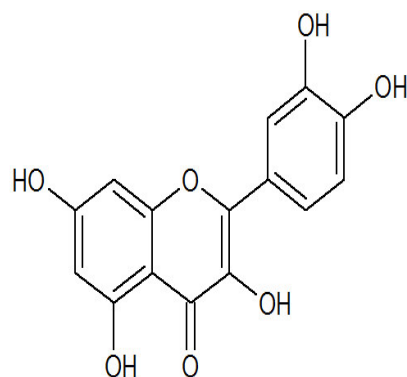
3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-Rhamnoglucosyl(RUTINA)

Fuente: Propia.



Fuente: Propia.

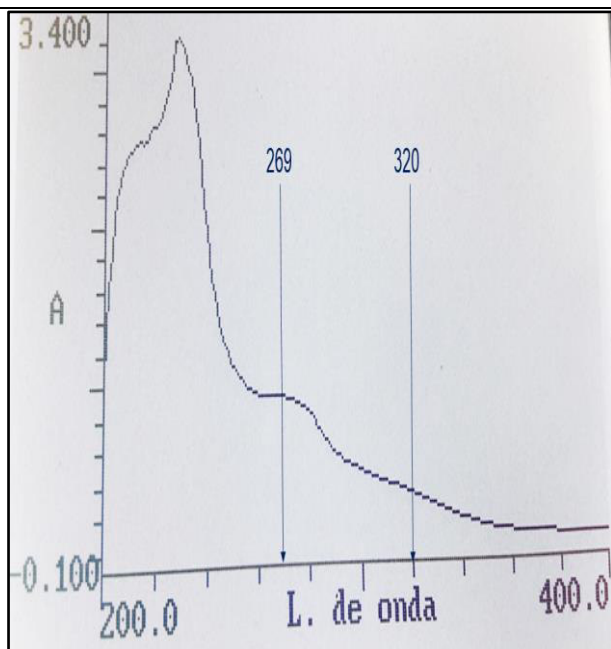
Componente 6 $\lambda_{\text{EtoH}}^{\text{máx}}$ 255, 269(h),
302(h), 371 nm



3',4',5,7- tetrahidroxi-3-O-Rutinósido (QUERCETINA)

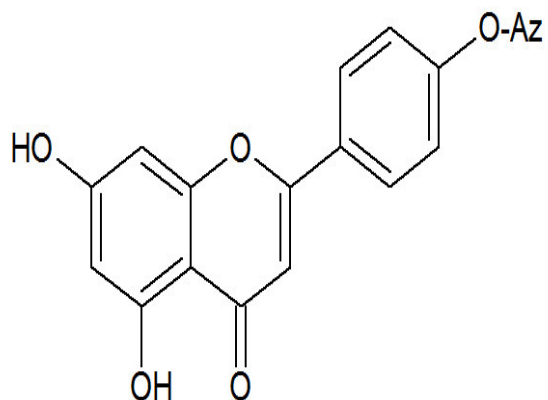
3',4',3,5,7-pentahidroxi-3-O-Rutinósido (QUERCETINA)

Fuente: Propia.



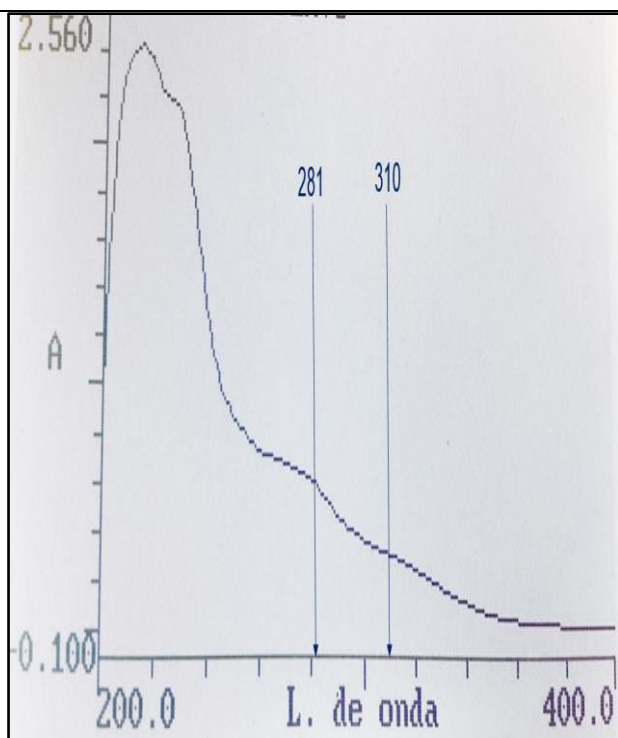
Fuente: Propia.

Componente 10 $\lambda_{\text{EtoH máx}}$ 269,320 nm



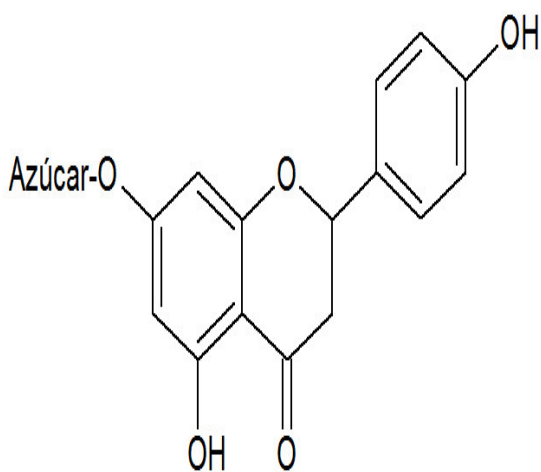
4'-O-Azúcar-5,7-dihydroxiflavona

Fuente: Propia.



Fuente: Propia.

Componente 11 $\lambda_{\text{EtoH máx}}$ 281,310 nm



7-O-Azúcar-4',5-dihidroxi flavanona

Fuente: Propia.

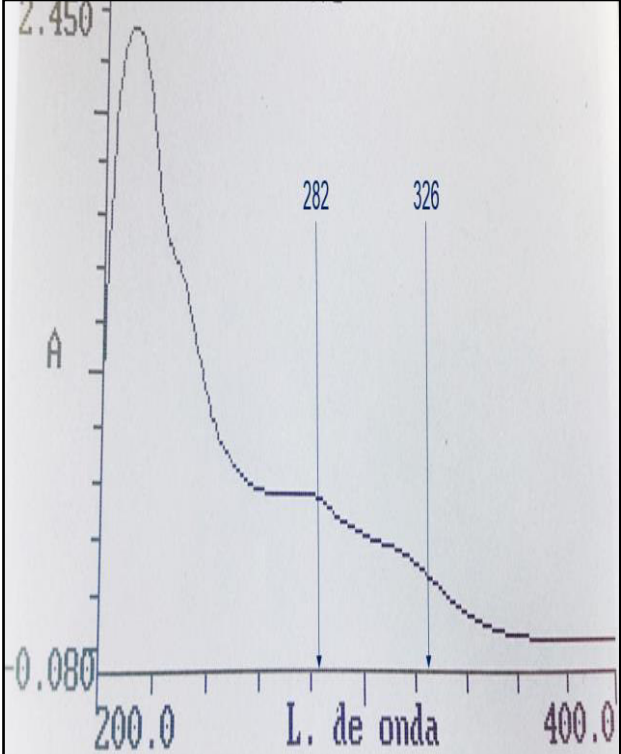
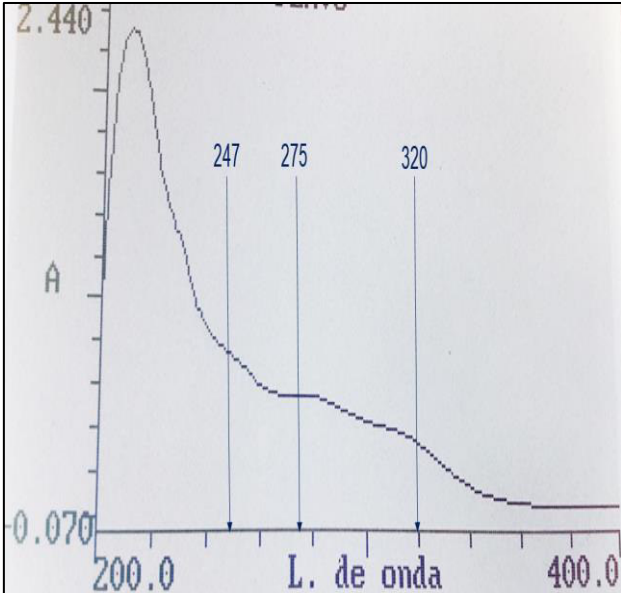
	<p>Componente 12 $\lambda_{\text{EtoH máx}}$ 282,326 nm</p> <chem>COc1cc(O)ccc1Oc2cc(O)c(O)c(O)c2OR</chem> <p>3',5-dihidroxi-4'-metoxi-7-O-Rhamnoglucosyl flavanona (HESPERIDINA)</p>
	<p>Componente 13 $\lambda_{\text{EtoH máx}}$ 247, 275, 320 nm</p> <chem>Oc1cc(O)c(O)c2cc(O)c(O)c2Oc3ccccc13</chem> <p>5,6,7-trihidroxi-4'-metoxi-7-O-Rhamnoglucosyl flavanona (BAICALEINA)</p>

Figura 9. Estructuras químicas propuestas tipo flavonoides presentes en el extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. 1) Espectro UV/Vis; 2) Estructura química propuesta.

4.3. Ensayos preclínicos

4.3.1. Efecto citotóxico

En el bioensayo de citotoxicidad en embriones de erizo de mar, la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ del extracto alcohólico hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. obtuvo efecto citotóxico. (Tabla 5 y Figura 10)

Tabla 5. Porcentaje de desarrollo de embriones de erizo de mar frente al control y extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. a las 48 horas.

	Control	40 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	120 $\mu\text{g/mL}$	160 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
Blástula	0	0	0	0	0	0
Gástrula	0	0	0	0	0	4
Prisma	100	100	100	100	100	47

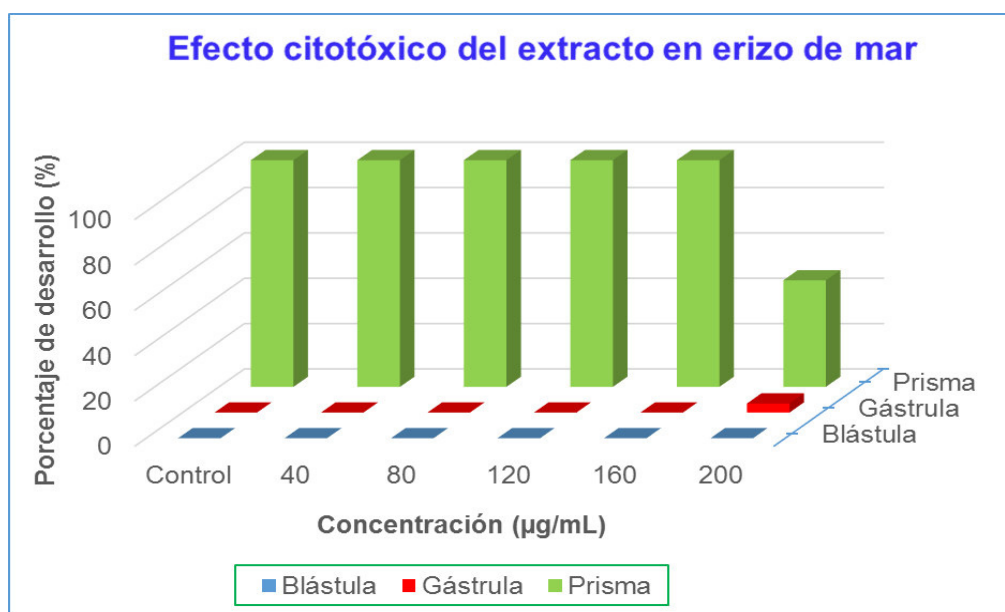


Figura 10. Desarrollo de embriones de erizo de mar frente al extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y control a las 48 horas.

Fuente: Propia.

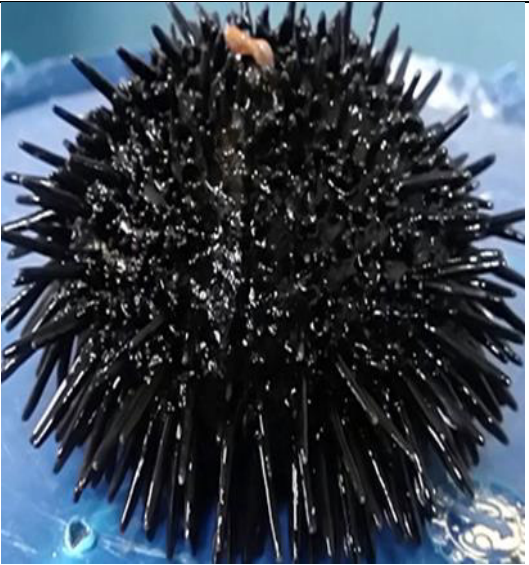

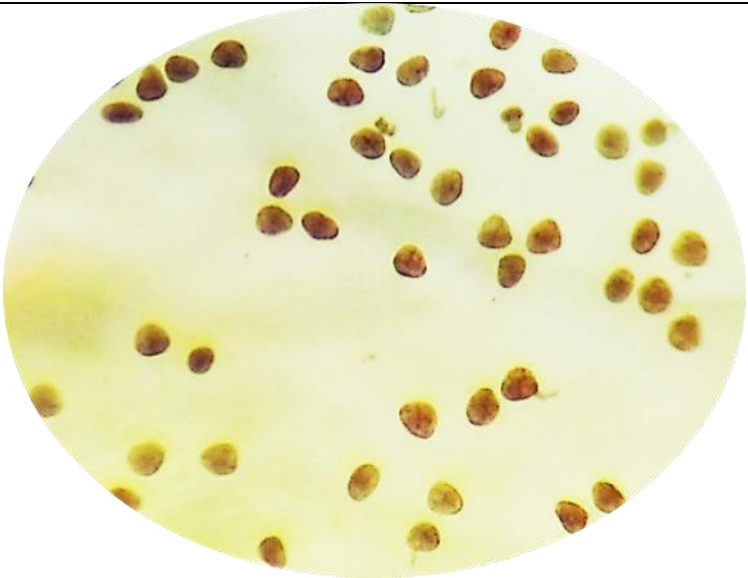
Erizo de mar	Fecundación <i>in vitro</i>
 <p data-bbox="399 856 623 894">Fuente: Propia.</p>	 <p data-bbox="987 856 1211 894">Fuente: Propia.</p>
Larva en estadio de prisma	
 <p data-bbox="1156 1549 1380 1587">Fuente: Propia.</p>	

Figura 11. Desarrollo embrionario del erizo de mar.

4.3.2. Efecto antitumoral

Al ejecutar el bioensayo de citotoxicidad en línea celular de fibroblastos normales de embrión de ratón BALB/c 3T3, la fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y el control positivo (5-Fluorouracilo) obtuvieron mayor efecto citotóxico al inhibir su crecimiento. (Tabla 6 y 7 y Figura 12)

Tabla 6. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de fibroblastos normales de embrión de ratón BALB/c 3T3 frente al tratamiento con extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y sus fracciones.

Concentraciones (µg/mL)	ET	F1	F2	F3
250.000	40.82	22.97	48.43	86.38
62.500	100.00	54.00	100.00	100.00
15.625	100.00	100.00	100.00	100.00
3.906	100.00	100.00	100.00	100.00
0.977	100.00	100.00	100.00	100.00
0.244	100.00	100.00	100.00	100.00

ET: Extracto total; F1: Fracción 1; F2: Fracción 2; F3: Fracción 3

Tabla 7. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de fibroblastos normales de embrión de ratón BALB/c 3T3 frente al control positivo (5-Fluorouracilo).

Concentraciones (µg/mL)	5FU
31.250	16.84
7.813	18.34
1.953	18.49
0.488	22.05
0.122	41.58
0.031	79.77

5FU: 5-Fluorouracilo

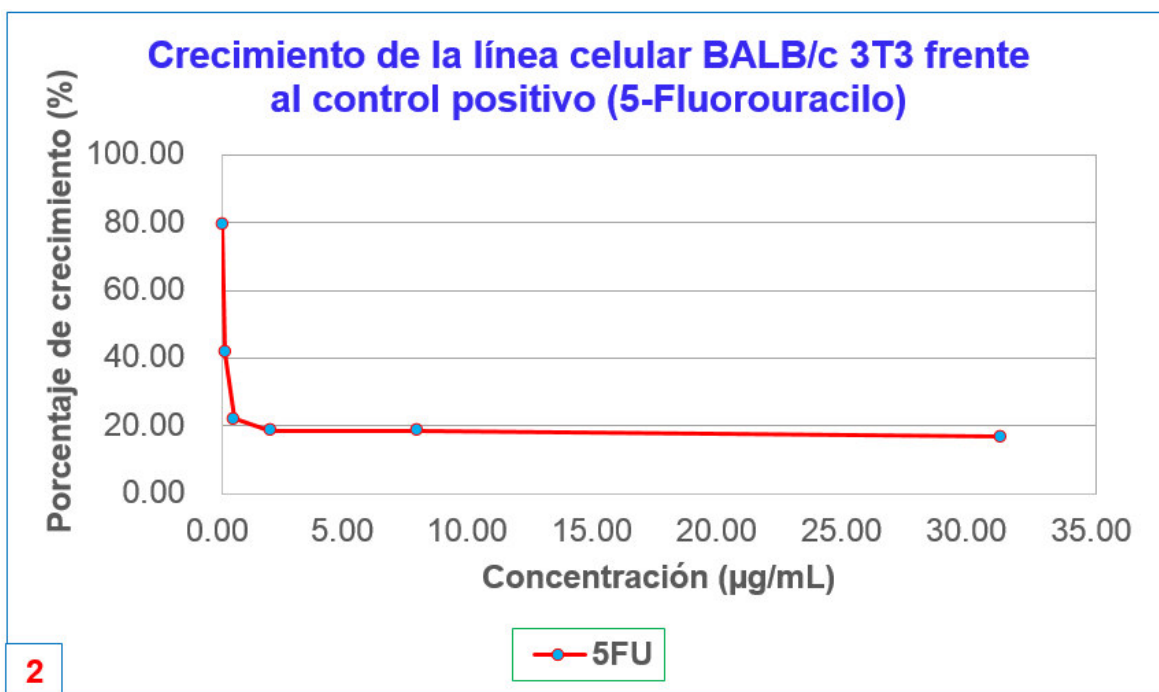
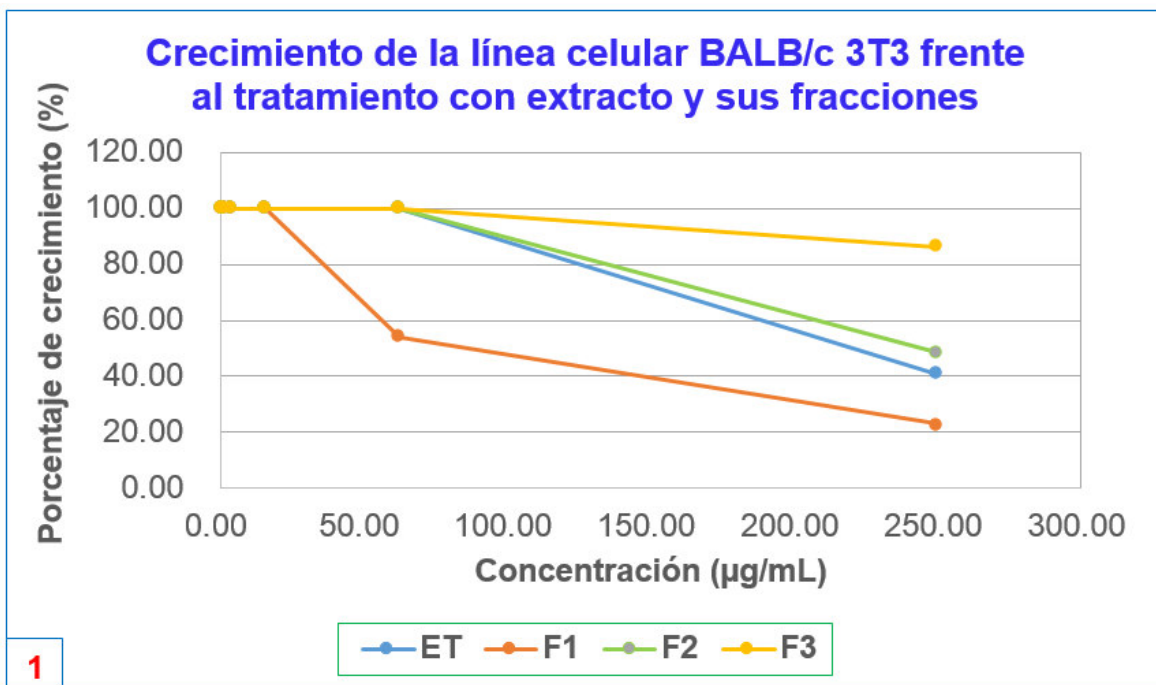


Figura 12. Crecimiento de la línea celular BALB/c 3T3. 1) Tratamiento con extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y sus fracciones; 2) Control positivo (5-Fluorouracilo).

Fuente: Propia.

Al ejecutar el bioensayo de citotoxicidad en línea celular de melanoma amelanótico humano M-14, la fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y el control positivo (5-Fluorouracilo) obtuvieron mayor efecto citotóxico al inhibir su crecimiento. (Tabla 8 y 9 y Figura 13)

Tabla 8. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de melanoma amelanótico humano M-14 frente al tratamiento con extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y sus fracciones.

Concentraciones (µg/mL)	ET	F1	F2	F3
250.000	10.96	13.14	21.96	42.29
62.500	97.17	18.42	100.00	100.00
15.625	100.00	97.68	100.00	100.00
3.906	100.00	98.70	100.00	100.00
0.977	100.00	100.00	100.00	100.00
0.244	100.00	100.00	100.00	100.00

ET: Extracto total; F1: Fracción 1; F2: Fracción 2; F3: Fracción 3

Tabla 9. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de melanoma amelanótico humano M-14 frente al control positivo (5-Fluorouracilo).

Concentraciones (µg/mL)	5FU
31.250	32.81
7.813	40.43
1.953	57.35
0.488	73.07
0.122	93.88
0.031	100.00

5FU: 5-Fluorouracilo

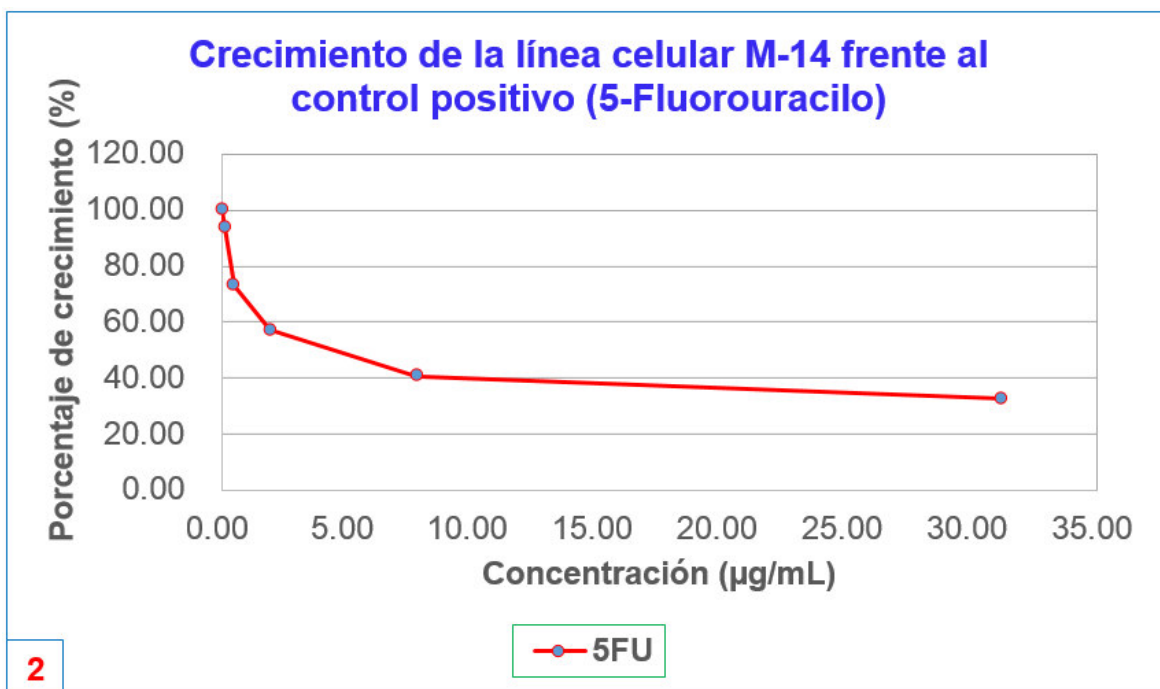
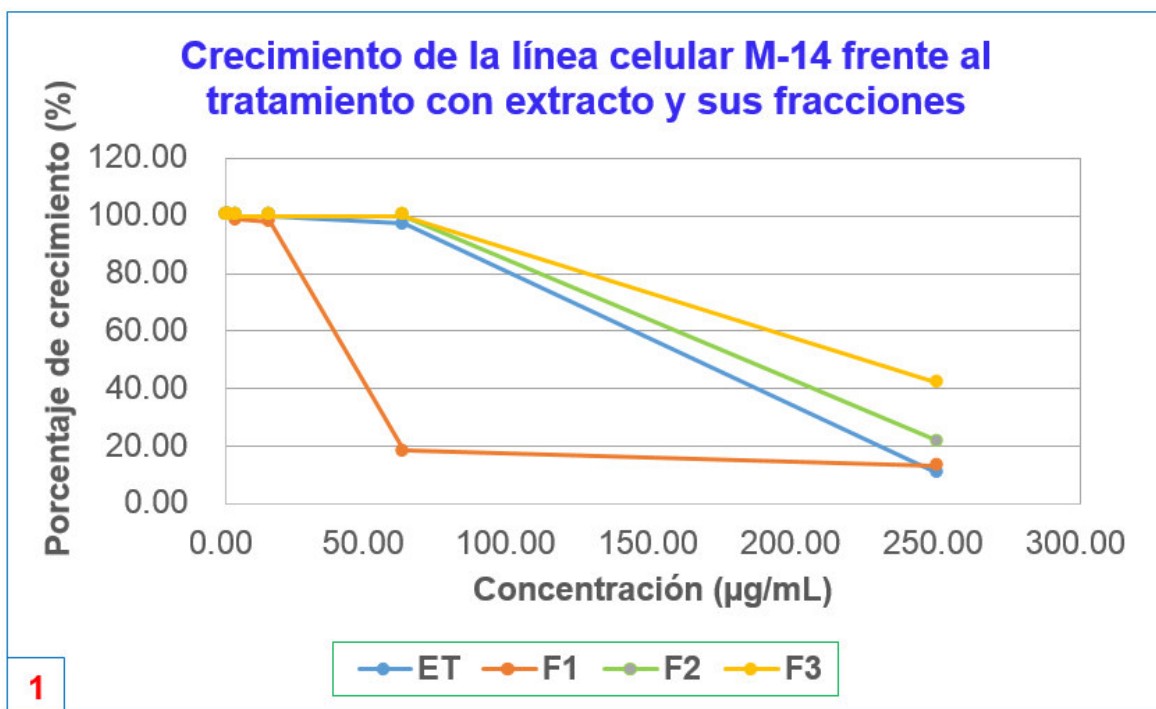


Figura 13. Crecimiento de la línea celular M-14. 1) Tratamiento con extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y sus fracciones; 2) Control positivo (5-Fluorouracilo).

Fuente: Propia.

Al ejecutar el bioensayo de citotoxicidad en línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29, la fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y el control positivo (5-Fluorouracilo) obtuvieron mayor efecto citotóxico al inhibir su crecimiento. (Tabla 10 y 11 y Figura 14)

Tabla 10. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 frente al tratamiento con extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y sus fracciones.

Concentraciones (µg/mL)	ET	F1	F2	F3
250.000	21.31	9.17	32.74	46.82
62.500	98.50	49.98	100.00	100.00
15.625	98.79	98.79	100.00	100.00
3.906	100.00	100.00	100.00	100.00
0.977	100.00	100.00	100.00	100.00
0.244	100.00	100.00	100.00	100.00

ET: Extracto total; F1: Fracción 1; F2: Fracción 2; F3: Fracción 3

Tabla 11. Porcentaje de crecimiento de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 frente al control positivo (5-Fluorouracilo).

Concentraciones (µg/mL)	5FU
31.250	14.71
7.813	24.41
1.953	35.88
0.488	62.24
0.122	94.33
0.031	99.43

5FU: 5-Fluorouracilo

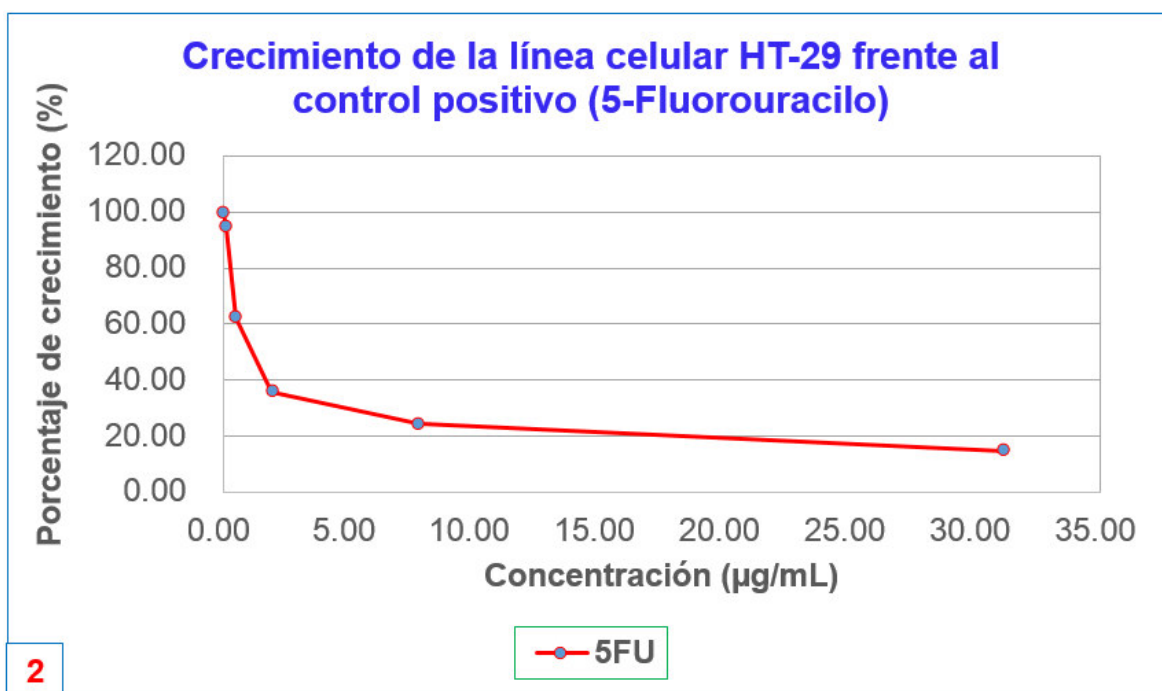
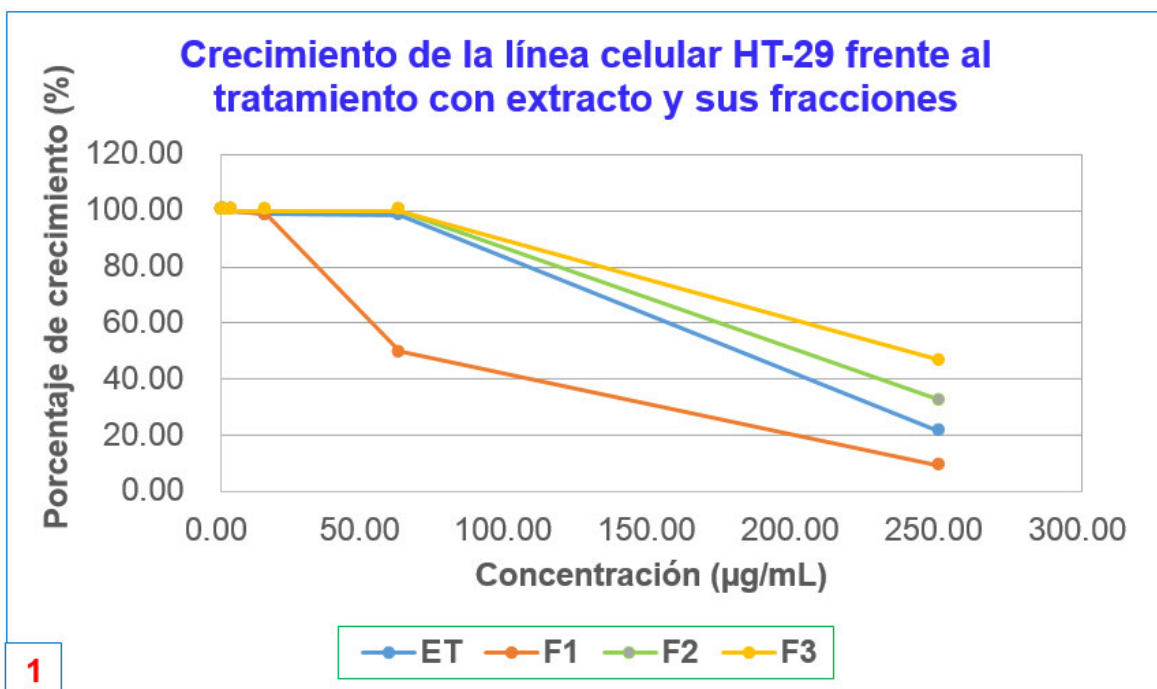


Figura 14. Crecimiento de la línea celular HT-29. 1) Tratamiento con extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y sus fracciones; 2) Control positivo (5-Fluorouracilo).

Fuente: Propia.

La fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. y el control positivo (5-Fluorouracilo) presentaron diferentes concentraciones inhibitorias de crecimiento del 50 % de células (GI50) frente a las distintas líneas celulares: BALB/c 3T3, M-14 y HT-29. (Tabla 12 y Figura 15)

Tabla 12. Concentración inhibitoria de crecimiento del 50 % de células (GI50) del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo) frente a las líneas celulares.

GI50	ET ($\mu\text{g/mL}$)	F1 ($\mu\text{g/mL}$)	F2 ($\mu\text{g/mL}$)	F3 ($\mu\text{g/mL}$)	5FU ($\mu\text{g/mL}$)
BALB/c 3T3	>100.00	78.90	>100.00	>100.00	0.13
M-14	>100.00	78.05	>100.00	>100.00	4.87
HT-29	>100.00	69.52	>100.00	>100.00	1.53

ET:Extracto total; F1:Fracción 1; F2:Fracción 2; F3:Fracción 3; 5FU:5-Fluorouracilo

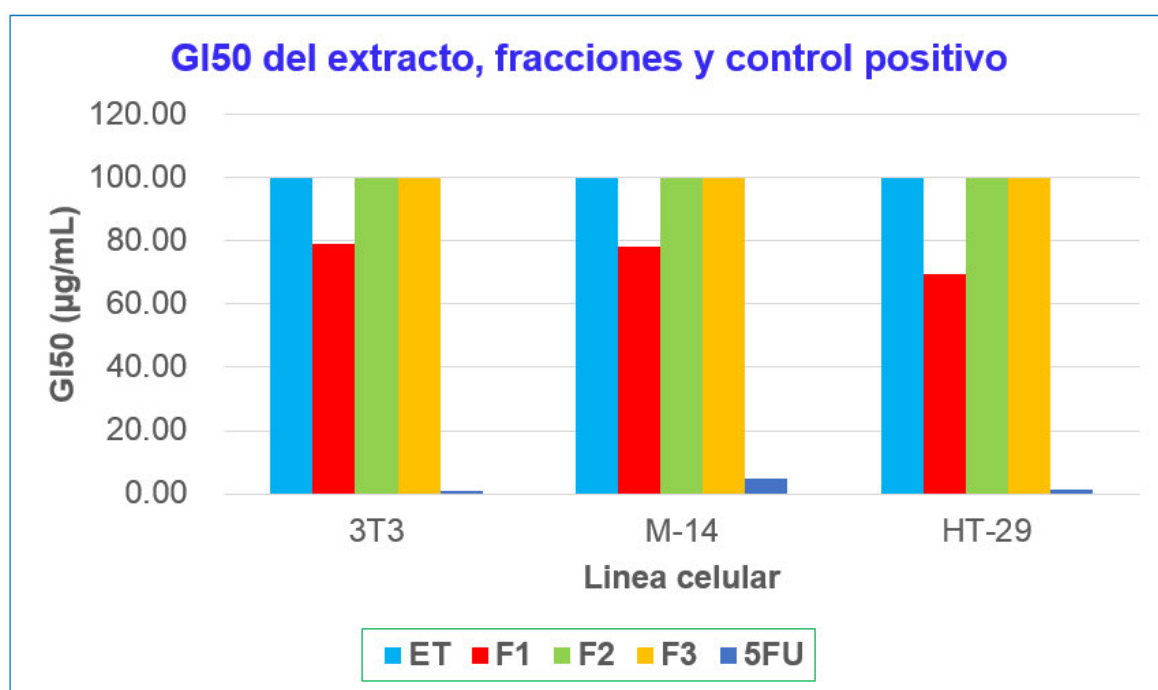


Figura 15. Concentración inhibitoria de crecimiento del 50 % de células (GI50) del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo) frente a las líneas celulares.

Fuente: Propia.

La fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. mostró mejor selectividad frente a la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 con un valor de 1,13 . (Tabla 13 y Figura 16)

Tabla 13. Índice de selectividad (IS) del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo) frente a las líneas celulares.

IS	ET	F1	F2	F3	5FU
M-14	1.00	1.01	1.00	1.00	0.03
HT-29	1.00	1.13	1.00	1.00	0.08

ET:Extracto total; F1:Fracción 1; F2:Fracción 2; F3:Fracción 3; 5FU:5-Fluorouracilo

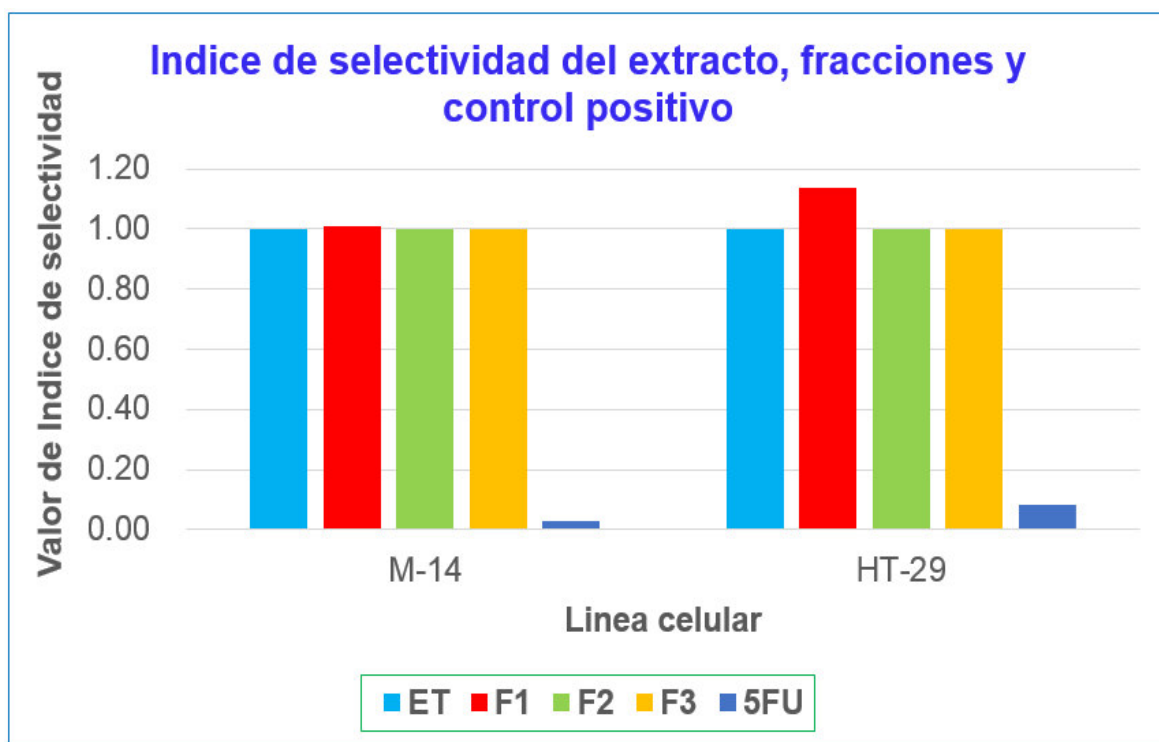


Figura 16. Índice de selectividad del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo) frente a las líneas celulares.

Fuente: Propia.

4.3.3. Actividad antioxidante

4.3.3.1. Actividad antioxidante empleando el radical ABTS^{•+}

En el ensayo de actividad antioxidante empleando radical ABTS^{•+}, el extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. obtuvo un buen porcentaje de inhibición a concentraciones bajas del extracto. (Tabla 14 y Figura 17)

Tabla 14. Porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical ABTS^{•+}

Extracto (µg/mL)	% Inhibición
0	0
2	12.96
4	23.87
6	35.55
8	47.19
10	60.41

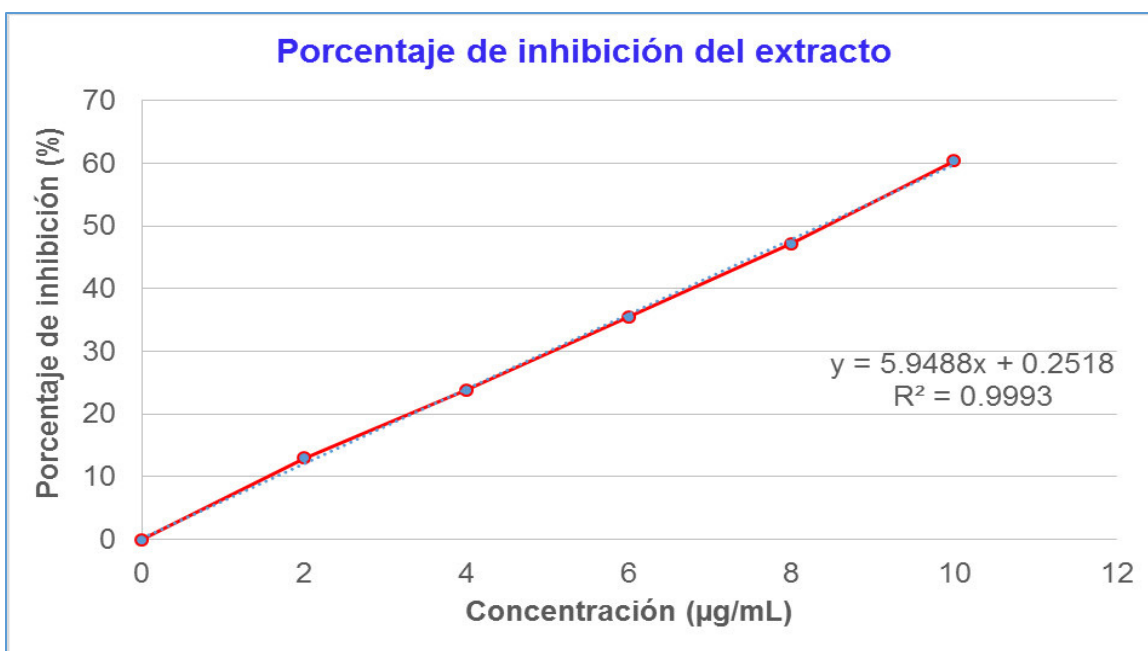


Figura 17. Porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical ABTS^{•+}

Fuente: Propia.

Asimismo, el IC₅₀ del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. se encontró cercano al estándar Trolox empleando radical ABTS^{•+}. (Tabla 15)

Tabla 15. Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical ABTS^{•+}

Muestras	IC ₅₀	TEAC-ABTS
Extracto alcohólico	8.39 µg/mL	0.36 µg Trolox/ µg Extracto
Estándar Trolox	2.98 µg/mL	-

IC₅₀: Concentración inhibitoria media; **TEAC:** Capacidad antioxidante equivalente al Trolox

4.3.3.2. Actividad antioxidante empleando el radical DPPH

En el ensayo de actividad antioxidante empleando radical DPPH, el extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. obtuvo un buen porcentaje de inhibición a concentraciones bajas del extracto. (Tabla 16 y Figura 18)

Tabla 16. Porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical DPPH.

Extracto (µg/mL)	% Inhibición
0	0
2.66	9.70
5.33	20.47
8	30.36
10.66	39.07
13.33	47.89
16	59.55

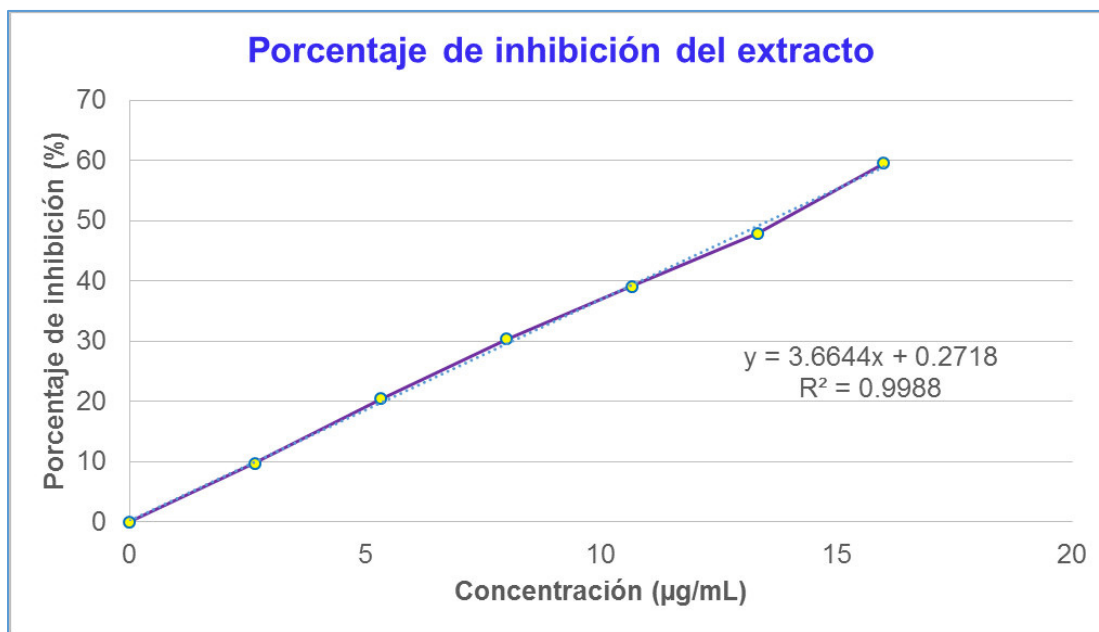


Figura 18. Porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical DPPH.

Fuente: Propia.

Igualmente, el IC50 del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. se encontró cercano al estándar Trolox empleando radical DPPH. (Tabla 17)

Tabla 17. Concentración inhibitoria media (IC50) y capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical DPPH.

Muestras	IC50	TEAC-DPPH
Extracto alcohólico	13.58 µg/mL	0.24 µg Trolox/ µg Extracto
Estándar Trolox	3.26 µg/mL	-

IC50: Concentración inhibitoria media; **TEAC:** Capacidad antioxidante equivalente al Trolox

4.3.4. Efecto antiinflamatorio

Al ejecutar el ensayo de efecto antiinflamatorio bajo el modelo de edema subplantar, la concentración de 25 mg/kg del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. obtuvo un mayor efecto antiinflamatorio . (Tabla 18 y Figura 19)

Tabla 18. Medición del edema subplantar inducido por carragenina a los grupos controles y tratamiento con extracto a diferentes dosis frente al tiempo.

Grupo	Basal	60'	180'	240'	300'	360'	420'
SSF	5.10 ± 0.10	8.33 ± 0.34	10.01 ± 0.19	10.70 ± 0.20	10.28 ± 0.15	10.74 ± 0.21	9.70 ± 0.18
Ibuprofeno	5.19 ± 0.09	6.48 ± 0.26	7.24 ± 0.15	8.35 ± 0.22	8.43 ± 0.27	8.18 ± 0.28	7.73 ± 0.22
Dexametasona	5.02 ± 0.03	6.04 ± 0.11	6.16 ± 0.18	7.25 ± 0.16	6.67 ± 0.13	6.73 ± 0.16	6.13 ± 0.02
Extracto 25	5.18 ± 0.04	7.71 ± 0.21	9.35 ± 0.47	8.99 ± 0.38	8.81 ± 0.47	8.54 ± 0.46	7.80 ± 0.43
Extracto 100	5.34 ± 0.08	8.61 ± 0.29	10.08 ± 0.16	10.36 ± 0.14	9.99 ± 0.14	9.97 ± 0.20	8.75 ± 0.11
Extracto 250	5.26 ± 0.05	7.73 ± 0.30	9.51 ± 0.43	9.83 ± 0.18	9.68 ± 0.23	9.22 ± 0.19	8.30 ± 0.22
Extracto 500	4.95 ± 0.08	7.85 ± 0.16	9.56 ± 0.28	9.41 ± 0.28	9.16 ± 0.23	8.66 ± 0.39	7.38 ± 0.36

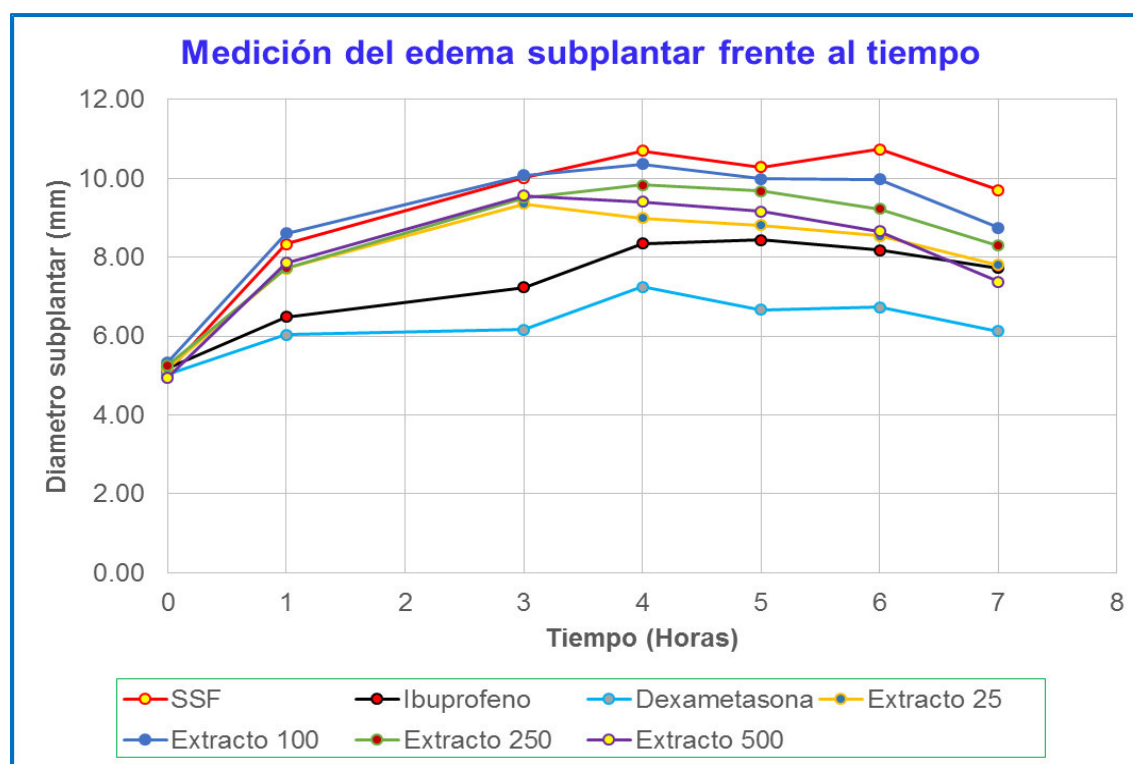


Figura 19. Medición del edema subplantar a los grupos controles y tratamiento con extracto alcohólico a diferentes dosis frente al tiempo. **Fuente:** Propia.

Además, la concentración de 25 mg/kg del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. alcanzó un porcentaje de eficiencia muy cercano al control positivo Ibuprofeno. (Tabla 19 y Figura 20)

Tabla 19. Porcentaje de eficiencia antiinflamatoria del extracto alcohólico a diferentes dosis y controles.

Grupo	1 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h
Ibuprofeno	60.06	58.25	43.57	37.45	46.99	44.78
Dexametasona	68.42	76.78	60.18	68.15	69.68	75.87
Extracto 25	21.67	15.07	31.96	29.92	40.43	43.04
Extracto 100	0.00	3.46	10.36	10.23	17.91	25.87
Extracto 250	23.53	13.44	18.39	14.67	29.79	33.91
Extracto 500	10.22	6.11	20.36	18.73	34.22	47.17

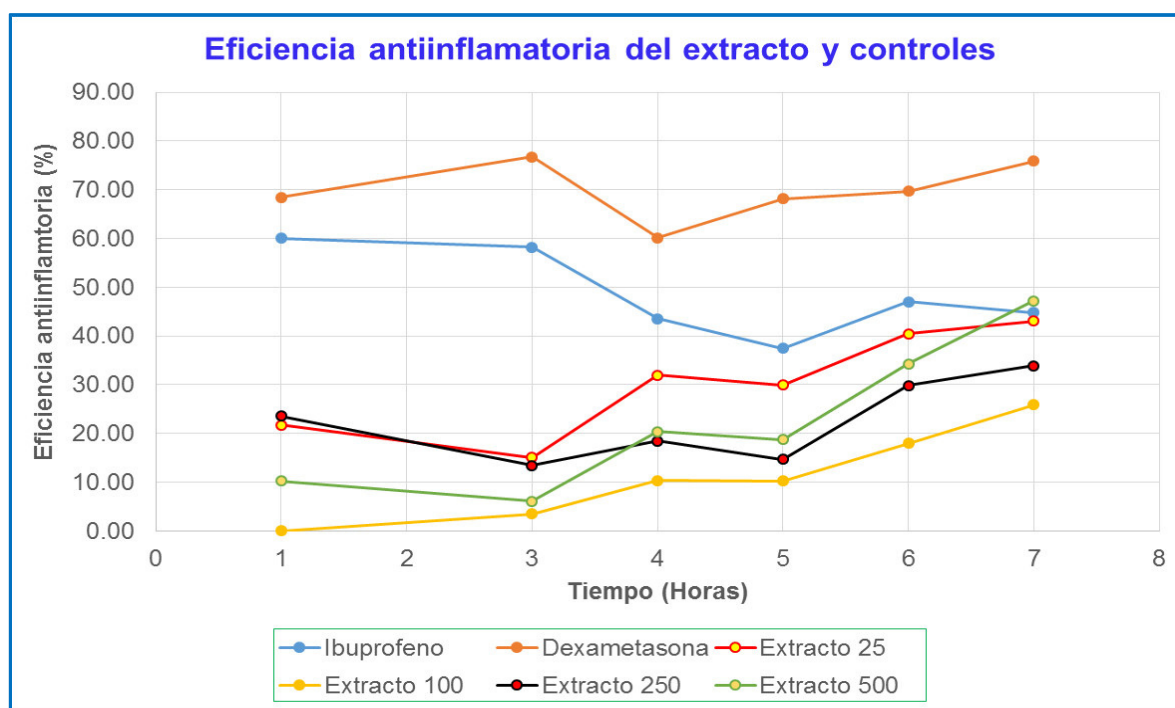


Figura 20. Eficiencia antiinflamatoria del extracto alcohólico a diferentes dosis y controles.

Fuente: Propia.

V. DISCUSIÓN

La especie ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. no reportó antecedentes sobre los ensayos botánicos, fitoquímicos y preclínicos *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, esta investigación es una de las primeras en realizar los estudios correspondientes y servir de soporte para futuros estudios.

El corte transversal de la hoja de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. presentó un tipo mesomórfico, donde la estructura bifacial exhibió un parénquima lagunar en dirección a la cara abaxial y un parénquima en empalizada en dirección a la cara adaxial, lo cual es acorde a Strasburger *et al.* para hojas de estructura bifacial ⁵². Además, el parénquima en empalizada es mucho más grueso y contiene abundantes cloroplastos, mientras, el parénquima esponjoso o lagunar es muy laxo y es el principal tejido transpirador ⁵², lo cual también se observó en la muestra. Por otra parte, el análisis anatómico vegetal del corte transversal evidenció haces vasculares los cuales presentaron vainas fasciculares, cuya finalidad es el transporte de sustancias entre los haces y el mesófilo ⁵² (Figura 3).

La investigación fitoquímica del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. mostró buena solubilidad en solventes polares y de mediana polaridad, lo que indicaría la presencia de metabolitos secundarios de naturaleza polar, entre los que estarían los flavonoides y glicósidos de flavonoides ^{5,53} (Tabla 2 y Figura 4).

En la detección preliminar de metabolitos secundarios mediante el tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. se

encontró flavonoides, alcaloides, glicósidos, lactonas sesquiterpénicas, entre otros; los cuales se encuentran en abundancia de acuerdo a las reacciones de coloración y precipitación respectiva. Mediante la reacción con tricloruro férrico (FeCl_3) se observó una coloración verde lo cual propone la presencia de un derivado del catecol. Asimismo, a través de la reacción de Shinoda, reacción específica para flavonoides, se evidenció una coloración de rojo a carmín lo cual sugeriría la presencia de flavonas y flavonoles ^{5,53-57} (Tabla 3 y Figura 5).

En la cromatografía en capa fina analítica, al comparar el extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. frente a estándares de flavonoides se evidenció la presencia de Rutina y Hesperidina. Además, el color celeste fluorescente indica posibles flavonas sin 5-OH libre y el púrpura posibles flavonoles (3-O substituidos) con 4'-OH ^{5,58,59} (Figura 6). Asimismo, empleando reveladores cromogénicos en la cromatografía se evidenció la presencia de alcaloides mediante el revelador de Dragendorff, observándose una coloración rojo ladrillo; flavonoides al emplear los reveladores ácido sulfúrico y vapores de amoníaco, observándose cambios de color o intensificación de las manchas; compuestos fenólicos mediante el revelador tricloruro férrico, observándose coloración azul o verde ^{5,59-61} (Figura 7).

En la cromatografía en capa fina preparativa del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. se encontraron quince manchas (Figura 9), de los cuales se propuso estructuras químicas de flavonoides a través de espectroscopía UV/Vis y comparadas con las estructuras publicadas por Mabry TJ *et al.* ⁴¹ y Lock O.⁵, obteniéndose cinco flavonas, presentando doble enlace en posición C2 y C3; dos flavonoles, presentando doble enlace en posición C2 y C3 y OH en posición C3

y dos flavanonas, sin presencia de doble enlace en posición C2 y C3 ^{5,53,62} (Figura 8).

Dentro de las estructuras químicas propuestas del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl., cabe resaltar el hallazgo de flavonoides característicos como Norwogonina glicosilada (5,8-O-diazúcar-7-hidroxiflavona), glicosilado en posición C5 y C8 de la flavona; Rutina (3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-Rhamnoglucosyl), glicosilado en posición C3 del flavonol; Quercetina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavonol); Apigenina glicosilada (4'-O-azúcar-5,7-dihidroxiflavona), glicosilado en posición C4' de la flavona; Naringenina glicosilada (7-O-azúcar-4',5-dihidroxiflavanona), glicosilado en posición C7 de la flavanona; Hesperidina (3',5-dihidroxiflavanona), glicosilado en posición C7 y Baicaleina (5,6,7-trihidroxiflavona), los cuales presentan diferentes propiedades farmacológicas ^{5,34-36,53,55} (Figura 9). A tener en cuenta que son propuestas de estructuras químicas de flavonoides, unos conocidos y otros por confirmar su estructura final.

De acuerdo a Gilbert ⁶³ y Paniagua et al.⁶⁴, el desarrollo normal de embriones de erizo de mar parte desde morula hasta pluteus a las 72 horas. Sin embargo, la concentración de 200 µg/mL del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. presentó efecto citotóxico en embriones de erizo de mar, observándose inhibición en su desarrollo de la fase de gástrula a prisma y descenso en su población a las 48 horas (Tabla 5 y Figura 10).

Estos cambios que generaron alteraciones en el desarrollo embrionario natural del erizo de mar podrían atribuirse a los alcaloides (por ejemplo, alcaloides tipo amonio

cuaternario ⁶⁵), compuestos fenólicos (por ejemplo, análogos de resveratrol a base de estilbeno ⁶⁶ y análogos de combretastatina ⁶⁷), terpenoides (por ejemplo, triterpenoides pentacíclicos ⁶⁸), y flavonoides (por ejemplo, derivados de pterocarpanos ⁶⁹) que se encontraron en el tamizaje fitoquímico y cromatografía, los cuales pueden ser de interés para estudios de componentes con posible efecto antitumoral (Tabla 3 y Figura 5-7).

De acuerdo al Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos de América, un extracto de una planta se califica con efecto citotóxico potencial si el GI50 es menor a 100 µg/mL ⁷⁰⁻⁷².

En el efecto antitumoral, la fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. mostró mejores resultados que el extracto total y sus demás fracciones, siendo así, para la línea celular BALB/c 3T3 (Fibroblastos normales de embrión de ratón BALB/c) se obtuvo un GI50 (Concentración inhibitoria de crecimiento del 50 % de células) de 78,90 µg/mL para la fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. y 0,13 µg/mL para el control positivo, 5-Fluoruracilo (Tabla 6, 7 y 12 y Figura 12 y 15).

Para la línea celular M-14 (Melanoma amelanótico humano) se obtuvo un GI50 de 78,05 µg/mL para la fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. y 4,87 µg/mL para el control positivo, 5-Fluoruracilo (Tabla 8, 9 y 12 y Figura 13 y 15). Son diversas las investigaciones de componentes bioactivos que presentan efecto citotóxico en líneas celulares de melanomas, entre las cuales tenemos al trabajo de Krajnović *et al.*, muestra el efecto antitumoral en dos líneas celulares de melanoma diferentes B16 y A375 del flavonoide prenilado del lúpulo

Isoxantohumol. Además, este estudio evidencia, por primera vez, que el Isoxantohumol sensibiliza a las células de melanoma a la acción del tratamiento con Paclitaxel *in vivo* ⁷³. Asimismo, en la investigación realizada por Rigano *et al.*, la exposición de células de la línea celular de melanoma humano M-14 a las isoflavonas extraídas por medio alcohólico inhibió su crecimiento y sugieren que estos metabolitos secundarios podrían desencadenar la muerte apoptótica en células M14 ⁷⁴.

Para la línea celular HT-29 (Adenocarcinoma de colon humano) se obtuvo un GI50 de 69,52 µg/mL para la fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. y 1,53 µg/mL para el control positivo, 5-Fluoruracilo (Tabla 10, 11 y 12 y Figura 14 y 15). Son diversas las investigaciones de componentes bioactivos que presentan efecto citotóxico en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, entre las cuales tenemos a Thundis *et al.*, donde evaluaron los efectos de la fracción metanólica de un extracto alcohólico en células de carcinoma colorrectal humano, RKO y Caco-2, presentando resultados positivos, los cuales podrían deberse a los metabolitos secundarios (luteolina, luteolina 7-O-glucosido, rutina y salvigenina) aislados e identificados en la respectiva fracción ⁷⁵. Adicionalmente, Ramos *et al.*, manifiestan que las naftoquinonas son componentes presentes en diferentes familias de plantas y de interés por sus diferentes actividades farmacológicas. Por lo tanto, evalúan la citotoxicidad y selectividad de nuevos derivados de 1,4-naftoquinona hacia línea celular de cáncer colorrectal HT-29 y células humanas normales, obteniéndose resultados favorables ⁷⁶.

Por lo tanto, el efecto citotóxico del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. en líneas celulares M-14 y HT-29 podría atribuirse a los flavonoides y naftoquinonas que se encontraron en el tamizaje fitoquímico y cromatografía (Tabla 3 y Figura 5-7).

Por otro lado, el índice de selectividad de la fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. mostró mejor resultado frente a la línea celular HT-29 (Adenocarcinoma de colon humano) con un valor de 1,13 , superando la unidad e indicando que el efecto es selectivo para células neoplásicas; contrariamente al 5-Fluoruracilo donde alcanzó un valor de 0,08 (Tabla 13 y Figura 16). Asimismo, otras investigaciones en extractos alcohólicos presentaron selectividad en línea celular de adenocarcinoma colorectal humano HT-29 ⁷⁷, permitiendo formar parte de alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer.

De acuerdo a las investigaciones, el menor valor de IC50 está directamente relacionado a una mayor actividad antioxidante ^{78,79}. Además, en otros estudios de investigación se han reportado criterios de clasificación de los extractos en base al IC50, calificando con alto potencial antioxidante aquellos extractos con valores menores a 30 µg/mL ^{46,80}.

La actividad antioxidante *in vitro* empleando el radical ABTS^{•+} obtuvo un buen porcentaje de inhibición a concentraciones bajas del extracto alcohólico y manifestó un IC50 (Concentración inhibitoria media) de 8,39 µg/mL para el extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. y 2,98 µg/mL para el estándar Trolox (Tabla 14 y 15 y Figura 17). Este valor indica un IC50 bajo con un alto potencial antioxidante para el extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl.

De la misma manera, se muestra un IC50 del extracto (8,39 µg/mL) cercano al estándar (2,98 µg/mL) lo que evidenció la mayor actividad antioxidante.

Además, presentó un TEAC-ABTS (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox) de 0,36 µg Trolox/ µg Extracto. En otros términos, cada µg del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. tiene una capacidad antioxidante equivalente a la de 0,36 µg de Trolox (Tabla 15).

La actividad antioxidante *in vitro* empleando DPPH obtuvo un buen porcentaje de inhibición a concentraciones bajas del extracto y manifestó un IC50 (Concentración inhibitoria media) de 13,58 µg/mL para el extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. y 3,26 µg/mL para el estándar Trolox (Tabla 16 y 17 y Figura 18). Este valor indica un IC50 bajo con un alto potencial antioxidante para el extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. De la misma manera, se muestra un IC50 del extracto (13,58 µg/mL) cercano al estándar (3,26 µg/mL) lo que evidenció la mayor actividad antioxidante.

Asimismo, presentó un TEAC-DPPH (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox) de 0,24 µg Trolox/ µg Extracto. En otros términos, cada µg del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. tiene una capacidad antioxidante equivalente a la de 0,24 µg de Trolox (Tabla 17).

El alto potencial antioxidante del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. expresado a través del IC50, exhibe una importante correlación entre ambos ensayos de actividad antioxidante *in vitro* empleando los radicales ABTS⁺ y DPPH, tal como se expone en otros estudios de investigación ^{46,81,82}.

La presencia de compuestos fenólicos en el extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. permitió potenciar la actividad antioxidante debido a que ellos son componentes bioactivos de plantas y presentan poderosa actividad antioxidante, entre los cuales destacan los flavonoides ya sean bajo la forma de agliconas y/o glicósidos ^{4,5, 83-86}. Además, los flavonoides son capaces de atrapar radicales libres directamente mediante la donación de átomos de hidrógeno. Adicionalmente, la actividad antioxidante *in vitro* de los flavonoides depende de la disposición de grupos funcionales en su núcleo estructural. Tanto la configuración, dobles enlaces, posiciones, tipos de sustituciones y número total de hidroxilos fenólicos influyen fundamentalmente en el mecanismo de la actividad antioxidante ⁸⁷⁻⁸⁹.

Por lo tanto, la actividad antioxidante empleando ABTS⁺ y DPPH del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. podría atribuirse a los compuestos fenólico, flavonoides y taninos que se encontraron en el tamizaje fitoquímico, cromatografía en capa fina analítica y preparativa y espectroscopía UV (Tabla 3 y Figura 5-9).

El edema subplantar inducido por carragenina lambda, modelo de inflamación aguda, presentó una primera fase que va desde el momento que se inicia la inflamación hasta aproximadamente una hora después, donde existe liberación de histamina, 5- hidroxitriptamina y bradiquinina ⁹⁰⁻⁹³. La segunda fase comenzó aproximadamente una hora después de la acción del agente flogógeno hasta 7 horas después, presentando producción elevada de prostaglandinas y óxido nítrico⁹⁰⁻⁹³ (Tabla 18 y Figura 19).

En el efecto antiinflamatorio empleando la técnica de edema subplantar inducida por carragenina, la concentración de 25 mg/kg del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. mostró un mayor efecto antiinflamatorio *in vivo* en ratas cepa Holtzman a partir de la 4 horas hasta las 7 horas de seguimiento, cuyo valor se encuentra cercano al control positivo Ibuprofeno (Tabla 18 y Figura 19). Cabe destacar que de acuerdo a otras investigaciones, la respuesta inflamatoria inducida por carragenina es máxima entre las 3 y 9 horas posteriores a la administración del flogógeno ^{94,95}, lo cual también se presentó en la investigación y permitió demostrar el efecto antiinflamatorio *in vivo* del extracto alcohólico (Tabla 18 y Figura 19).

De igual manera, al evaluar la eficiencia antiinflamatoria frente a los controles, se encuentra que la dosis de 25 mg/kg del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. presentó una eficiencia gradual en relación al tiempo alcanzando el 43,04 % a las 7 horas, cuyo valor se encontró cercano al control positivo Ibuprofeno (44,78%); contrariamente al segundo control positivo Dexametasona, cuyo valor 75,87 % de eficiencia antiinflamatoria fue mucho mayor (Tabla 19 y Figura 20). Conforme a otra investigación, se encontró eficiencias antiinflamatorias dosis dependiente de flavonoides extraídos por medio alcohólico cercanas al 40% ⁴⁹, lo cual indicó el potencial antiinflamatorio del extracto alcohólico total similar al de un extracto de flavonoides.

Según el CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) y otros investigadores, la inhibición de la inflamación inducida por carragenina en ratas exhibe una significativa correlación con el efecto

antiinflamatorio en clínica y ha demostrado ser altamente predictivo con el efecto de fármacos antiinflamatorios utilizados en humanos ^{48,96, 97}.

La búsqueda de sustancias alternativas capaces de interrumpir el proceso inflamatorio y la disminución de los efectos adversos de los medicamentos convencionales se han convertido en un objetivo importante en la investigación científica ^{98,99}.

Según los estudios revisados, los alcaloides, flavonoides e incluso combinaciones de ellos son los metabolitos secundarios responsables del efecto antiinflamatorio en diversos trabajos de investigación de plantas medicinales ⁹⁹⁻¹⁰¹.

Por otra parte, el efecto antiinflamatorio de los flavonoides podría atribuirse al doble enlace en posición C2-C3, disposición de hidroxilos, metoxilación, entre otros ¹⁰². Además, de acuerdo a diversos estudios, los flavonoides inhiben la producción de óxido nítrico, ciclooxigenasas, prostaglandinas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas, especies reactivas de oxígeno, entre otros ^{49, 103, 104}.

Por lo tanto, el efecto antiinflamatorio *in vivo* del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. podría atribuirse a los flavonoides y alcaloides que se encontraron en el tamizaje fitoquímico, cromatografía en capa fina analítica y preparativa y espectroscopía UV (Tabla 3 y Figura 5-9).

VI. CONCLUSIONES

1. Se propone nueve estructuras de flavonoides determinadas mediante el análisis espectroscópico UV/Vis del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl.; siendo estas cinco flavonas, dos flavonoles y dos flavanonas.
2. La concentración de 200 µg/mL del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. presentó efecto citotóxico en embriones de erizo de mar.
3. La fracción 1 del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. presentó efecto antitumoral, clasificado como potencial según el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos de América, con un GI50 a 78,05 µg/mL para la línea celular tumoral M-14 y 69,52 µg/mL para la línea celular tumoral HT-29.
4. El extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. presentó actividad antioxidante *in vitro* empleando radicales ABTS⁺ y DPPH, con un IC50 de 8,39 µg/mL y 13,58 µg/mL, respectivamente.
5. El extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. presentó a 25 mg/kg de peso su mayor efecto antiinflamatorio en ratas albinas hembras cepa Holtzman de 2,5 meses.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos complementarios para confirmar las estructuras de flavonoides propuestos en el extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl.
2. Elaborar ensayos de toxicidad del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. en modelos de mayor complejidad.
3. Evaluar el efecto antioxidante *in vivo* del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl.
4. Evaluar el efecto del extracto alcohólico de hojas de ***Hesperomeles cuneata*** Lindl. en un modelo de inflamación crónica.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. *Nat Prod Commun.* marzo de 2016; 11(3):315–37.
2. Chabner B, Lynch T, Longo D. Harrison Manual de Oncología. México: McGraw-Hill; 2009. 626 p.
3. Porth CM. Fundamentos de fisiopatología: Alteraciones de la salud. Conceptos básicos. 3ª edición. Barcelona: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 40-55.
4. Kabera J, Semana E, Mussa A, He X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2014; 2 (7): 377-392.
5. Lock O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2a ed. Lima: Fondo Editorial PUCP; 1994. 213 p.
6. De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macia M, Balslev H. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Quito: Herbario QCA & Herbario AAU; 2008. 947 p.
7. Mostacero J, Mejia F, Zelada W, Medina C. Biogeografía del Perú. 1º Edición. Lima: Asamblea Nacional de Rectores; 2007. Pag: 260.
8. Challice J. Phenolic compounds of the subfamily pomoidae: A chemotaxonomic survey. *Phytochemistry.* Volume 12, Issue 5, May 1973, Pages 1095-1101. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942273850228>.
9. Louati S, Simmonds M, Grayer R, Kite G, Damak M. Flavonoids from *Eriobotrya japonica* (Rosaceae) growing in Tunisia. *Biochemical Systematics*

- and Ecology. Volume 31, Issue 1, January 2003, Pages 99-101. Disponible en : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197802000728>
10. Ribeiro D, Freitas M, Lima JLFC, Fernandes E. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. Med Res Rev 2015 09;35(5):877-936. Disponible en: <http://search.proquest.com/docview/1701946075/34AB4469CFFA4AEAPQ/2?accountid=12268>
 11. Mulvihill E, Burke A, Huff M. Citrus Flavonoids as Regulators of Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. Annual Review of Nutrition. Volume 36, 2016:275-299. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-nutr-071715-050718>.
 12. García-lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno MA, Martínez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. Inflammation Res 2009 09;58(9):537-52. Disponible en: <http://search.proquest.com/docview/216240028/fulltextPDF/C51B31DA733246E9PQ/1?accountid=12268>
 13. Singh R, Sharma S, Singh P. Antioxidants: Their Health Benefits and Plant Sources. En: Prakash D, Sharma G, editores. Phytochemicals of nutraceutical importance [Internet]. India: CABI;2014.p.248-65.doi: 10.1079/9781780643632.0248
 14. Mejia-Giraldo J., Henao-Zuluaga K., Gallardo C., Atehortua L., Puertas-Mejia M. Novel *In vitro* Antioxidant and Photoprotection Capacity of Plants from High

- Altitude Ecosystem of Colombia. Photochemistry and Photobiology 2016; 92 : 150-157.
15. Singh N, Tailor D, Kale R, Singh R. Antioxidant Phytochemicals in Cancer Chemoprevention. En: Prakash D, Sharma G, editores. Phytochemicals of nutraceutical importance [Internet]. India: CABI;2014. 229-47.doi: 10.1079/9781780643632.0248
16. Prakash D, Gupta C. Role of Antioxidant Polyphenols in Nutraceuticals and Human Health. En: Prakash D, Sharma G, editores. Phytochemicals of nutraceutical importance [Internet]. India: CABI;2014.208-28. doi: 10.1079/9781780643632.0248
17. Ulloa Ulloa C, Moller P. Árboles y Arbustos de los Andes del Ecuador. Quito: AAU Reports 30; 1993.p.200-210.
18. Miñano Zavaleta A. Evaluación taxonómica y ecogeográfica de las especies vegetales del área de pasivos ambientales mineros en ticapampa-ancash, Perú con fines de fitorremediación. [tesis doctoral en Internet]. [Trujillo]: Universidad Nacional de Trujillo; 2009 [citado 20 de abril de 2018]. Recuperado a partir de: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/5408>.
19. Soukup J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. Lima: Editorial Salesiana; 1978.p.201-204.
20. Mostacero J, Mejía F, Peláez F. Fitogeografía del norte del Perú. Trujillo: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; 1996.p.279-281.
21. Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología Humana.6ª Edición. En: López-Vega J, Flórez J, editores. Quimioterapia antineoplásica. Barcelona: Elsevier Masson; 2014.p. 907-941.

22. Hose J. Potencial uses of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenetic and embryologic endpoints. *J. Appl. Toxicol.* 1985; 5 (4): 245-254.
23. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren J, Bokesch H, Kenney S, Boyd M. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82(13): 1107-1112.
24. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols.* 2006; 1(3): 1112-1116
25. Monks A, *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991; 83: 757–766
26. Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12° Edición. En: Osterhoudt K, Penning T, editores. Toxicidad e intoxicación por fármacos. México: McGraw-Hill; 2012.p.73-87.
27. Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12° Edición. En: Chabner B, editor. Principios de tratamiento antineoplásico. México: McGraw-Hill; 2012.p.1667-1675.
28. Porth CM. Fundamentos de fisiopatología: Alteraciones de la salud. Conceptos básicos. 3ª edición. En: Merkle C, editor. Respuestas celulares al estrés, la lesión y el envejecimiento. Barcelona: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.p. 33-50.
29. Corrales L, Muñoz M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Nova [Internet]. 2012 [citado 21 de abril de 2018];

10(18):213-225. Recuperado a partir de:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702012000200009&lng=en.

30. Porth CM. Fundamentos de fisiopatología: Alteraciones de la salud. Conceptos básicos. 3ª edición. En: Merkle C, editor. Inflamación, reacción inflamatoria y fiebre. Barcelona: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 51-72.
31. Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología Humana. 5ª Edición. En: Fera M, editor. Fármacos analgésicos antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos. Barcelona: Elsevier Masson; 2008. p. 421-455.
32. Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología Humana. 5ª Edición. En: Flórez J, editor. Esteroides corticales y antiinflamatorios esteroideos. Barcelona: Elsevier Masson; 2008. p. 1023-1038.
33. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2(12): 1231-1246. doi: 10.3390/nu2121231
34. Pan M, Lai C, Ho C. Anti-inflammatory activity of natural dietary. *Food & function*. 2010; 1(1):15-31. doi: 10.1039/C0FO00103A
35. Holban A, Grumezescu A. Diet, Microbiome and Health. *Handbook of Food Bioengineering*, Volume 11. En: Tsanova-Savova S, Denev P, Ribarova F, editores. *Flavonoids in Foods and Their Role in Healthy Nutrition*. London: Academic Press; 2018. p. 165-198. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811440-7.00007-7>
36. Williams R, Spencer J, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules?. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 36 (7): 838-849. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001>

37. Johansen D. Plant Microtechnique. 1ra ed. New York: McGraw-Hill Book Company; 1940. 521 p.
38. D'Ambrogio de Argüeso A. Técnicas en Histología Vegetal. 1ra ed. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur; 1986. 286 p.
39. Ruzin S. Plant microtechnique and microscopy. New York: Oxford University Press; 1999. 336p.
40. Pérez A, Tomasi V. Tinción con azul brillante de cresilo en secciones vegetales con parafina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica [Internet]. 2002 [citado 02 de mayo de 2018]; 37:211-215. Recuperado a partir de: http://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/38885/CONICET_Digital_Nro.2625a075-e9bf-42f0-8d92-219e67da5b19_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
41. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. New York-Heidelberg-Berlín: Springer-Verlag; 1970.
42. Retuerto F, Arbaiza E, Quiroz-Garrido Y, Estrada R, Zavala J. Biological activity of the venom from *Anthothoe chilensis* (Lesson, 1830) (Actiniaria: Sagartiidae). Rev. peru biol. [Internet]. 2007 [citado 02 de mayo de 2018]; 14(2): 277-282. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300015&lng=es.
43. Castro A, Juárez J, Ramos N, Suarez S, Retuerto F, Gonzales S. Elucidación estructural del aceite esencial de *Ruta Graveolens* L. Ruda, actividad antioxidante y bioensayo de citotoxicidad. Ciencia e Investigación [Internet]. 2011 [citado 02 de mayo de 2018]; 14(1):25-28. Recuperado a partir de : http://200.62.146.19/BVRevistas/ciencia/v14_n1/pdf/a05v14n1.pdf

44. Quispe-Mauricio A, Callacondo D, Rojas J, Zavala D, Posso M, Vaisberg A. Cytotoxic effect of *Physalis peruviana* in cell culture of colorectal and prostate cancer and chronic myeloid leukemia. Rev. gastroenterol. Perú [Internet]. 2009 [citado 02 de mayo de 2018]; 29(3): 239-246. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292009000300006&lng=es
45. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, And Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 1999;26(9/10):1231-37.
46. Troya-Santos J, Ale-Borja N, Suárez-Cunza S. *In vitro* antioxidant capacity of traditional prepared black maca (*Lepidium meyenii*). Revista de la Sociedad Química del Perú [Internet]. 2017 [citado 02 de mayo de 2018]; 83(1): 40-51. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000100005&lng=es&tlng=en.
47. Chávez R, Plaza A, Lock O. Antioxidantes de origen vegetal. Revista de Química. 1996; X (1): 71-101
48. Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J. Manual de Modelos Experimentales de Farmacología. Lima: Publicaciones ASDIMOR; 2004 .p. 59-62.
49. Enciso E, Arroyo J. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. An. Fac. med. [Internet]. 2011 [citado 02 de mayo de 2018]; 72(4): 231-237. Recuperado a partir de:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832011000400002&lng=es.

50. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eight Edition [Internet]. Washington, DC: The National Academies Press; 2011. [citado 02 de mayo de 2018].248p. Recuperado a partir de: <http://nap.edu/12910>
51. Ley 30407: Ley de Protección y Bienestar Animal [Internet].Peru: El Peruano; 2016. [citado 02 de mayo de 2018]. Recuperado a partir de: <http://busquedas.elperuano.com.pe/normaslegales/ley-de-proteccion-y-bienestar-animal-ley-n-30407-1331474-1/>
52. Strasburger E, Noll F, Schenck H, Schimper A. Tratado de Botánica.35ªEdicion. Barcelona: Ediciones Omega; 2004.1134 p.
53. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Ediciones Omega; 2000.515p.
54. Domínguez X. “Métodos de Investigación Fitoquímica”. México: Limusa; 1973.281 p.
55. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales.2ª Edición. Zaragoza: Editorial Acribia; 2001. 1099 p.
56. Gibaja S. “Guía para el Análisis de los Compuestos del Carbono”. Lima: Editorial UNMSM;1977.
57. Farnsworth N. Biological and Phytochemical Screening of Plants. Journal of pharmaceutical sciences.1966; 55 (3): 225-275.

58. Geissman T. "The Chemistry of Flavonoid Compounds". New York: Pergamon Press; 1962.
59. Markham, K. "Techniques of Flavonoid Identification". London: Academic Press; 1982.
60. Stahl E. "Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook" 2nd Edition. Berlin- Heidelberg: Springer-Verlag; 1969.
61. Wagner H, Bladt S, Zgainski E. "Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas". Berlin- Heidelberg: Springer-Verlag; 1984
62. Dewick P. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 3rd Edition. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd; 2009. 539 p.
63. Gilbert S. Biología del desarrollo. 7° Edición. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 2006. 902 p.
64. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, Sáez F. Citología e Histología Vegetal y Animal. 4° Edición. Madrid: McGraw-Hill- Interamericana de España; 2007.
65. Rojas Y, Soto R, Anaya E, Retuerto F, Fuertes C. Efecto antitumoral de los alcaloides hidrosolubles de *Abuta grandifolia* (MART) *Sandwith*, en línea celular HEP-2. Ciencia e Investigación [Internet]. 2004 [citado 13 de junio de 2018]; 7(1): 22-27. Recuperado a partir de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3354>
66. De Lima D, Rotta R, Beatriz A, Marques M, Montenegro R, Vasconcellos M; Pessoa C, De Moraes M, Costa-Lotufo L, Frankland A, Eberlin M. Synthesis and biological evaluation of cytotoxic properties of stilbene-based resveratrol

- analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry* .2009; 44(2):701-707.
doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.05.003
67. Demchuk D, Samet A, Chernysheva N, Ushkarov V, Stashina G, Konyushkin L, Raihstat M, Firgang S, Philchenkov A, Zavelevich M, Kuiava L, Chekhun V, Blokhin D, Kiselyov A, Semenova M, Semenov V. Synthesis and antiproliferative activity of conformationally restricted 1,2,3-triazole analogues of combretastatins in the sea urchin embryo model and against human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014; 22(2):738-755.
doi.org/10.1016/j.bmc.2013.12.015
68. Anisimov M, Shentsova E, Shcheglov V, Strigina L, Chetyrina N, Aladjina N, Vecherko L, Zorina A, Matyukhina L, Saltykova I. Toxic effects of certain pentacyclic triterpenoids on early embryogenesis of the sea urchin. *Toxicon*. 1976; 14 (4): 259-265. doi.org/10.1016/0041-0101(76)90021-0
69. Militão G, Pinheiro S, Dantas I, Pessoa C, De Moraes M, Costa-Lotufo L, Lima M, Silveira E. Bioassay-guided fractionation of pterocarpanes from roots of *Harpalyce brasiliensis* Benth. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.2007; 15 (21):6687-6691. doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.011
70. Díaz A, Rodríguez H, Scull R. Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549. *Rev Cubana Farm [Internet]*. 2011 [citado 16 de junio de 2018] ; 45(1): 101-108. Recuperado a partir de:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152011000100011&lng=es.

71. Jabit ML, Wahyuni F, Khalid R, Israf D, Haari K, Lajis N, Stanslas J. Cytotoxic and nitric oxide inhibitory activities of methanol extracts of *Garcinia* species. *Pharmaceutical Biol.* 2009;47 (11):1019-26.
72. Boik J. *Natural Compounds in Cancer Therapy*. Princeton, Minn, USA: Oregon Medical Press; 2001.
73. Krajnović T, Kaluđerović G, Wessjohann L, Mijatović S, Maksimović-Ivanić D. Versatile antitumor potential of isoxanthohumol: Enhancement of paclitaxel activity *in vivo*. *Pharmacological research*. 2016; 105:62-73. doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.011
74. Rigano D, Cardile V, Formisano C, Maldini M, Piacente S, Bevelacqua Y, Russo A, Senatore F. *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions*. 2009; 180 (2): 211-219. doi.org/10.1016/j.cbi.2009.02.010
75. Tundis R, Lacopetta D, Sinicropi M, Bonesi M; Leporini M, Passalacqua N, Ceramella J, Menichini F, Loizzo M. Assessment of antioxidant, antitumor and pro-apoptotic effects of *Salvia fruticosa* Mill. subsp. *thomasii* (Lacaita) Brullo, Guglielmo, Pavone & Terrasi (Lamiaceae). *Food and Chemical Toxicology*. 2017; 106 (A): 155-164. doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.040
76. Ramos J, Couliadiati T, Monteiro A, Campos L, Wagner V, Nascimento R, De Amorim C, Machado D. Antitumoral activity of novel 1,4-naphthoquinone derivative involves L-type calcium channel activation in human colorectal cancer cell line. *Journal of Applied Biomedicine*. 2016; 14 (3): 229-234. doi.org/10.1016/j.jab.2016.03.002

77. Quispe-Mauricio A, Callacondo D, Rojas J, Zavala D, Posso M, Vaisberg A. Cytotoxic effect of *Physalis peruviana* in cell culture of colorectal and prostate cancer and chronic myeloid leukemia. Rev. gastroenterol. Perú [Internet]. 2009 [citado 22 de junio de 2018] ; 29(3): 239-246. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292009000300006&lng=es.
78. Zhu K, Lian C, Guo X, Peng W, Zhou H. Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. Food Chemistry. 2011;126(3):1122-1126. doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.144
79. Aguado M, Nuñez M, Bela A, Okulik N, Bregni C. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). Rev. mex. cienc. farm [Internet]. 2013 [citado 26 de junio de 2018] ; 44(3): 46-51. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000300006&lng=es.
80. Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez C, Rivero R. Screening and antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 87(2-3): 241-246. doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00156-9
81. Babbar N, Oberoi H, Uppal D, Patil R. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. Food Research International. 2011; 44(1): 391–396. doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.001
82. Floegel A, Kim D, Chung S, Koo S, Chun O. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods.

- Journal of Food Composition and Analysis. 2011; 24 (7): 1043–1048.
doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008
83. Adebisi O, Olayemi F, Ning-Hua T, Guang-Zhi Z. *In vitro* antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2017; 6(1): 10-14. doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.12.003
84. Al-Rifai A. Identification and evaluation of in-vitro antioxidant phenolic compounds from the *Calendula tripterocarpa* Rupr. South African Journal of Botany. 2018; 116: 238-244. doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.007
85. Sytar O, Hemmerich I, Zivcak M, Rauh C, Brestic M. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. Saudi Journal of Biological Sciences. 2018; 25 (4): 631-641. doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.036
86. Cao J, Xia X, Dai X, Xiao J, Wang Q, Andrae-Marobela K, Okatch H. Flavonoids profiles, antioxidant, acetylcholinesterase inhibition activities of extract from *Dryothyrum boryanum* (Willd.) Ching. Food and Chemical Toxicology. 2013; 55: 121-128. doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.051
87. Li K, Fan H, Yin P, Yang L, Xue Q, Li X, Sun L, Liu Y. Structure-activity relationship of eight high content flavonoids analyzed with a preliminary assign-score method and their contribution to antioxidant ability of flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots. Arabian Journal of Chemistry. 2018; 11(2): 159-170. doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.08.002
88. Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional

Biochemistry. 2002; 13(10): 572-584. doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5





89. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011; 82 (4): 513-523. doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018
90. Winyard P, Willoughby D. Inflammation Protocols. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2003.p. 115-121. doi.org/10.1385/1592593747
91. D'Acquisto F, Ialenti A, Iannaro A, Di Vaio R, Carnuccio R. Local administration of transcription factor decoy oligonucleotides to nuclear factor-kB prevents carrageenin-induced inflammation in rat hind paw. *Gene Therapy* [Internet]. 2000 [citado 02 de julio de 2018]; 7(20): 1731–1737. Recuperado a partir de: <https://www.nature.com/articles/3301295>
92. Ialenti A, Iannaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 1992; 211: 701–706. doi.org/10.1016/0014-2999(92)90526-A
93. Salvemini D et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 1996; 118 (4): 829–838. doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15475.x
94. Fossati A. Antiinflammatory effects of Seaprose-S on various inflammation models. *Drugs Exp Clin Res* [Internet]. 1999 [citado 02 de julio de 2018]; 25(6): 263-270. Recuperado a partir de: <https://europepmc.org/abstract/med/10713864>

95. Planas E, Sánchez S, Rodríguez L, Pol O, Puig M. Antinociceptive/Anti-Edema Effects of Liposomal Morphine during Acute Inflammation of the Rat Paw. *Pharmacology*.2000; 60 (3): 121-127. doi.org/10.1159/000028356
96. Giráldez R. Cursos sobre modelos de inflamación. En: Taller nacional sobre inflamación. La Habana, Cuba: Sociedad Cubana de Farmacología; 2001.p 18-35.
97. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de técnicas de investigación. Proyecto X-I Búsqueda de principios activos en plantas medicinales.1995:81-3.
98. Bernstein N, Akram M, Daniyal M, Koltai H, Fridlender M, Gorelick J. Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites. *Advances in Agronomy*. 2018; 150: 131-183. doi.org/10.1016/bs.agron.2018.02.003
99. Martino V. Los flavonoides como promisorios. Agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farm. Bonaerense*.2000; 19 (4): 303-308.
100. Metrouh-Amir H, Amir N. Evaluation in vivo of anti-inflammatory and analgesic properties of *Matricaria pubescens* alkaloids. *South African Journal of Botany*.2018; 116:168-174. doi.org/10.1016/j.sajb.2018.03.008
101. Han Q, Ren Y, Li G, Xiang K, Dai S. Flavonoid alkaloids from *Scutellaria moniliorrhiza* with anti-inflammatory activities and inhibitory activities against aldose reductase. *Phytochemistry*.2018; 152: 91-96. doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.001

102. Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 13 (1): 12-23. doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004
103. Harborne J, Williams C. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000; 55 (6): 481-504. doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1
104. Wang X, Huang H, Ma X, Wang L, Liu C, Hou B, Yang S, Zhang L, Du G. Anti-inflammatory effects and mechanism of the total flavonoids from *Artemisia scoparia* Waldst. et kit. *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 104: 390-403. doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.054

IX. ANEXOS


Anexo I. Constancia taxonómica de la planta.

	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA MUSEO DE HISTORIA NATURAL	
"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"		
CONSTANCIA N° 236-USM-2015		
LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:		
La muestra vegetal (tallo, hoja y flor) recibida de Gustavo Adolfo FERNÁNDEZ REBAZA ; estudiante de la UNMSM de la Fac. de Farmacia y Bioquímica; ha sido estudiada y clasificada como: <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).		
DIVISION: MAGNOLIOPHYTA		
CLASE: MAGNOLIOPSIDA		
SUBCLASE: ROSIDAE		
ORDEN: ROSALES		
FAMILIA: ROSACEAE		
GENERO: <i>Hesperomeles</i>		
ESPECIE: <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl.		
Nombre vulgar: "sungo"		
Determinado por Mag. Hamilton Beltrán Santiago.		
Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.		
Fecha, 09 de noviembre de 2015		
		
 Dra. Haydee Montoya Terreros JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)		
Av. Arenales 1256, Jesús María Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú	Teléfono: (511) 471-0117, 470-4471, 470-7918, 619-7000 anexo 5703	e-mail: museohn@unmsm.edu.pe http://museohn.unmsm.edu.pe

Anexo II. Certificado de adquisición de animales del bioterio del Instituto Nacional de Salud.

	INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLOGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO	
CERTIFICADO SANITARIO N°		023-2018
Producto	: Rata Albina	Lote N° : R – 01- 2018
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad : 42
Cepa	: Holtzman	Edad : 2.5 meses
Peso	: 200-250 g.	Sexo : hembras
G.R..	: 035318	Destino : Fernández Rebaza, Gustavo
Lima	: 02-02-2018	
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo Rosales Fernández. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.</p> <p>*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p> <p>Chorrillos, 02 de febrero del 2018 (Fecha de atención y emisión del certificado)</p> <p>NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p>		
		 M.V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586

Anexo III. Documento de aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

	<p>Universidad Nacional Mayor de San Marcos Universidad del Perú. Decana de América Facultad de Farmacia y Bioquímica</p>	
<p>UNIDAD DE INVESTIGACIÓN "AÑO DEL DIÁLOGO Y RECONCILIACIÓN NACIONAL"</p>		
<p>Oficio N° 00067/FFB-UI/2018</p>		
<p>Lima, 02 de mayo de 2018</p>		
<p>Señor Gustavo Adolfo Fernández Rebaza <u>Presente.-</u></p>		
<p>Ref.: Documento c/f 12/10/2017</p>		
<p>Asunto: EL QUE SE INDICA</p>		
<p>Por medio de la presente lo saludo muy cordialmente y en atención al documento de la referencia, le informo el Proyecto de Tesis de Pregrado titulado: "Efecto citotóxico, antitumoral, antioxidante in vitro y antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de <i>Hesperomeles cuneata</i> Lindl. y estructura química de sus flavonoides", ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Ética de nuestra Facultad; el cual se encuentra certificado con el registro N° Nro. 001-CE-UDI-FFB-2018.</p>		
<p>Sin otro en particular, hago propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi especial consideración y estima.</p>		
<p>Atentamente</p>		
<p> Dra. María Elena Salazar Salvatierra Directora</p>		
<p>/Mch</p>		
<p>"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"</p>		
<p>Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 - Lima 1 E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe</p>		
		

Anexo IV. Efecto citotóxico en embriones de erizo de mar

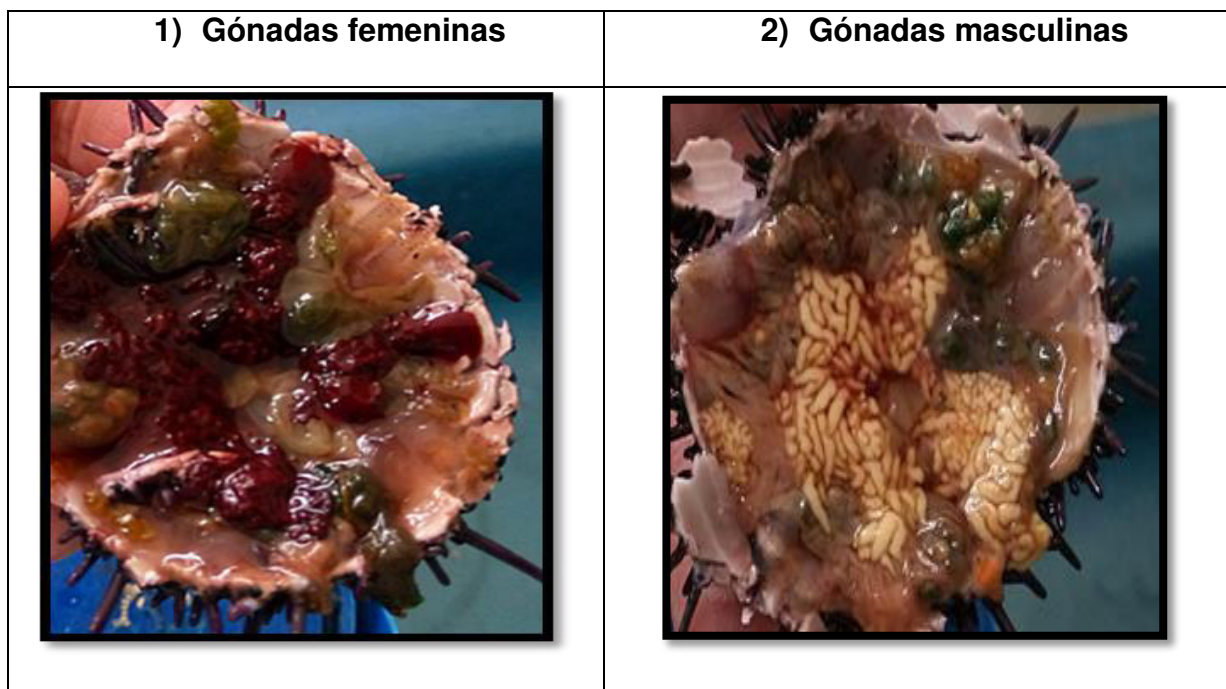


Figura 21. Gónadas del erizo de mar (*Tetrapygus niger*). 1) Gónadas femeninas; 2) Gónadas masculinas

Fuente: Propia.



Figura 22. Distintas concentraciones del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. en agua de mar filtrada.

Fuente: Propia.

Anexo V. Efecto citotóxico sobre la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29.

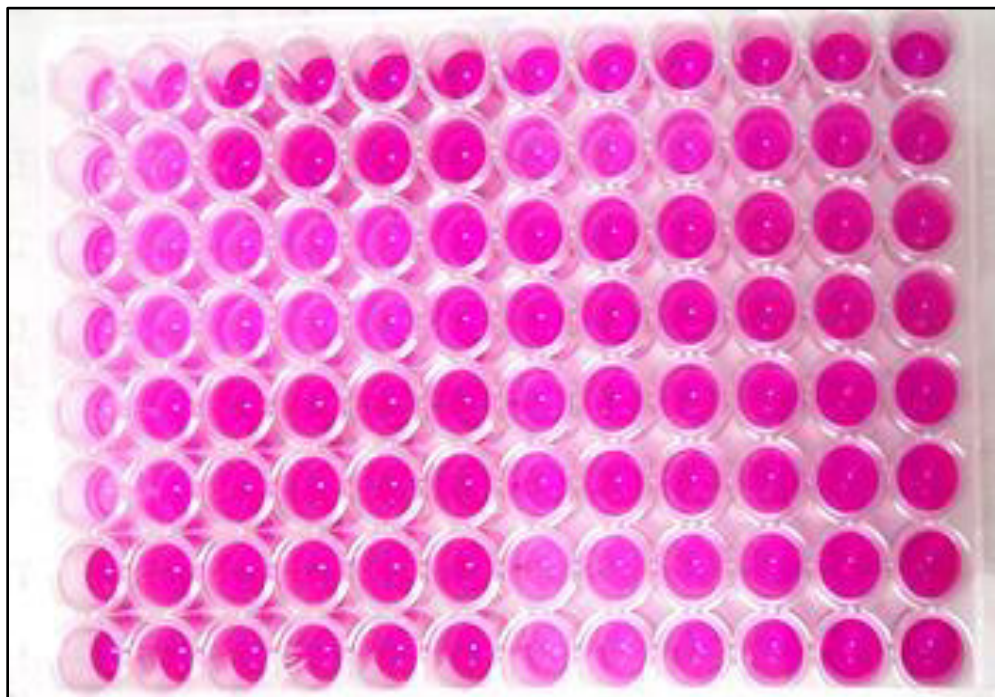


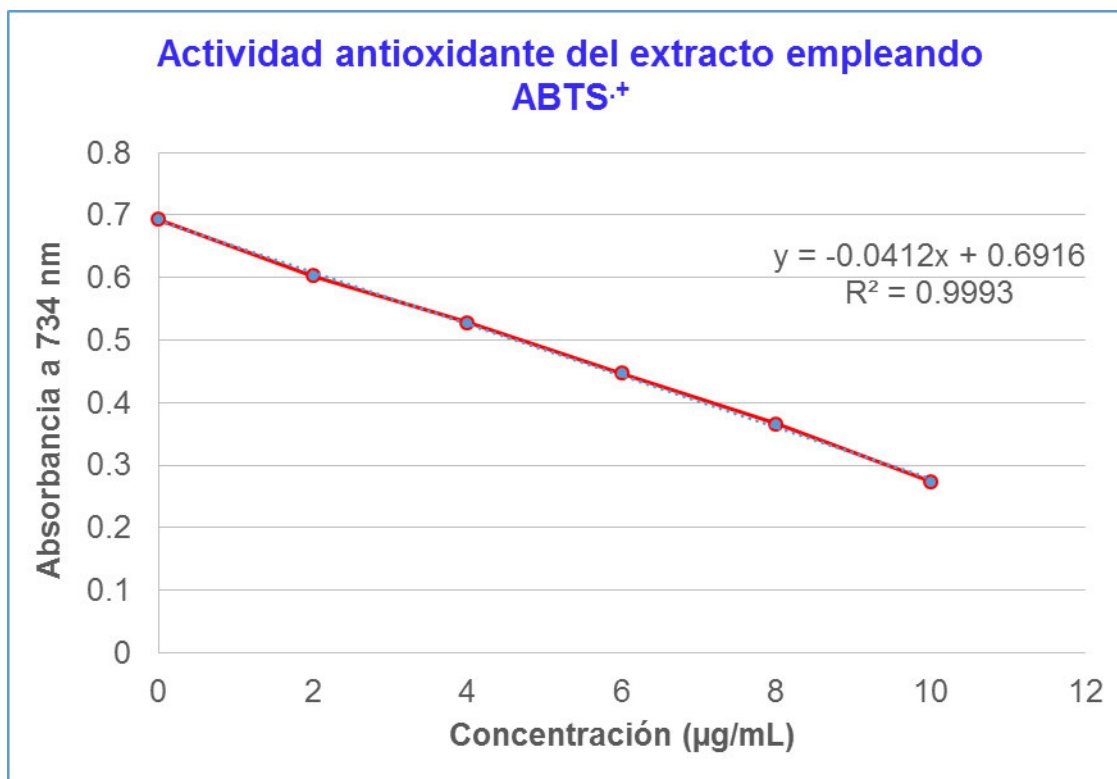
Figura 23. Citotoxicidad sobre la línea celular HT-29 del tratamiento con extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl., fracciones del extracto alcohólico y control positivo (5-Fluorouracilo).

Fuente: Propia.

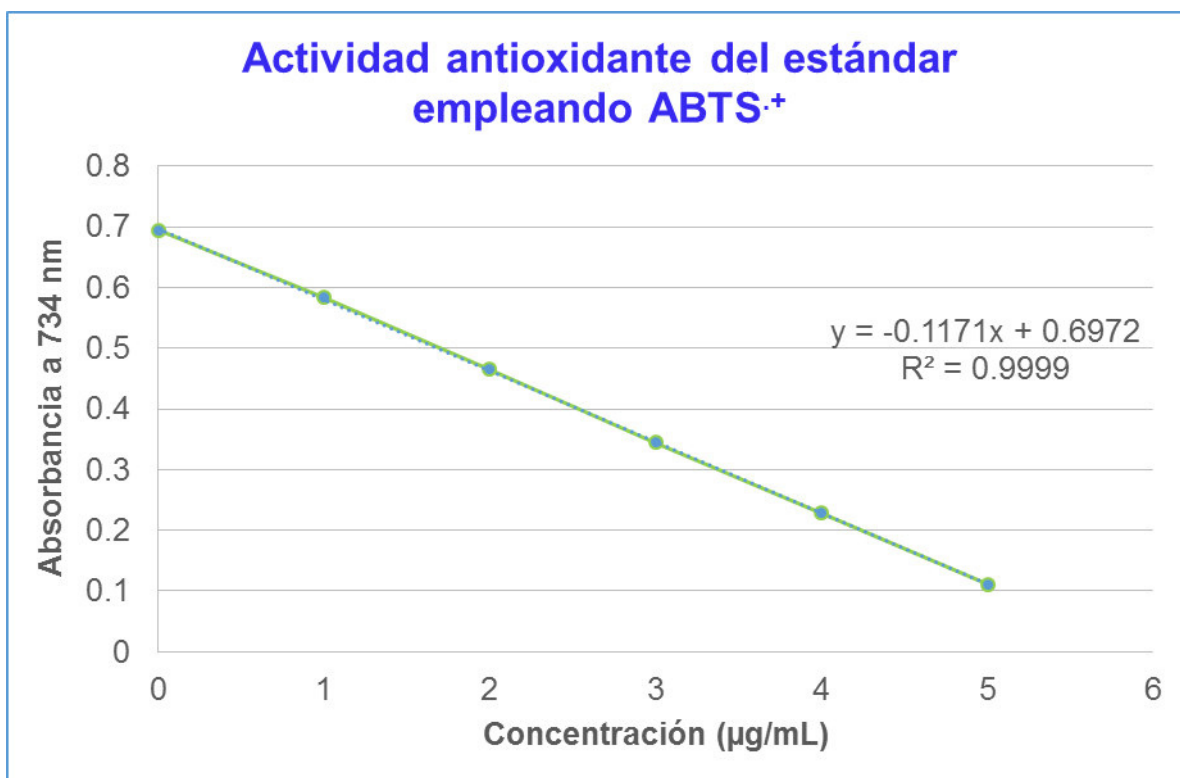
Anexo VI. Actividad antioxidante empleando radical ABTS^{•+}

Tabla 20. Actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical ABTS^{•+}

Extracto (µg/mL)	Absorbancia (Promedio)
0	0.693
2	0.604
4	0.528
6	0.447
8	0.366
10	0.275



IC₅₀ = 8.39 µg/mL



IC50= 2.98 µg/mL

Figura 24. Actividad antioxidante empleando radical ABTS^{•+} 1) Extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. 2) Estándar Trolox.

Fuente: Propia.



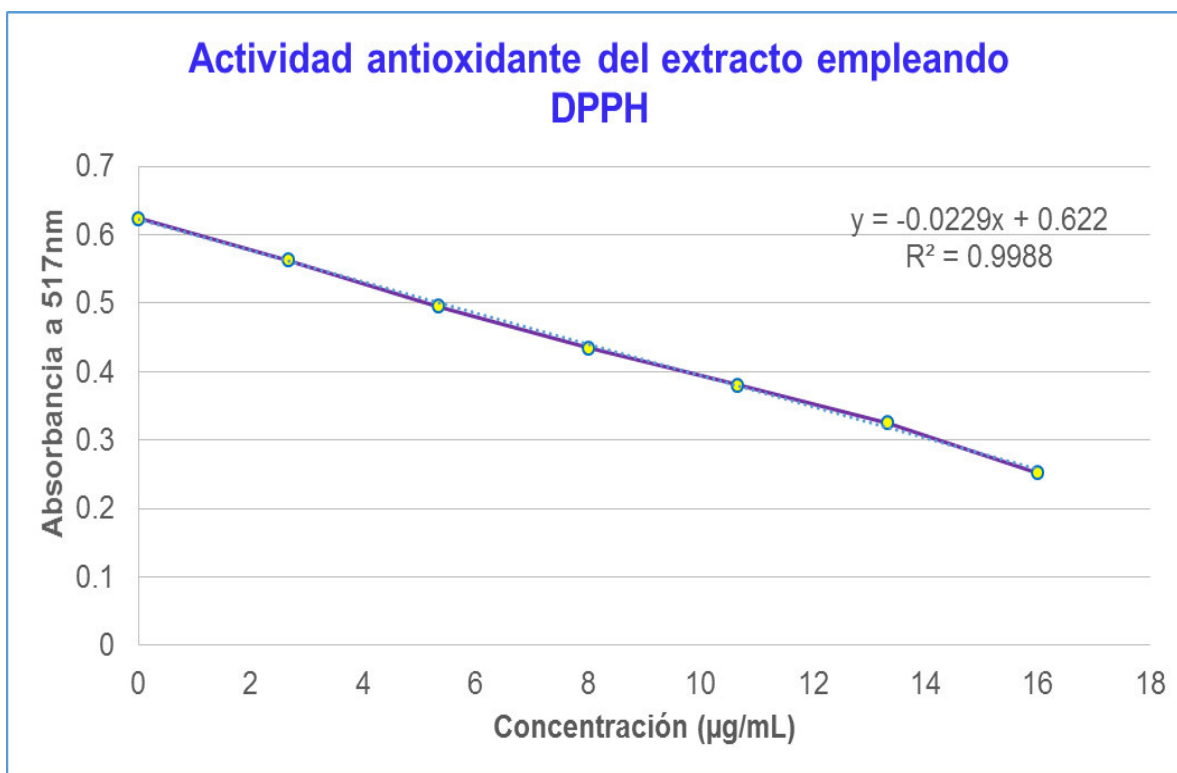
Figura 25. Actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical ABTS^{•+}

Fuente: Propia.

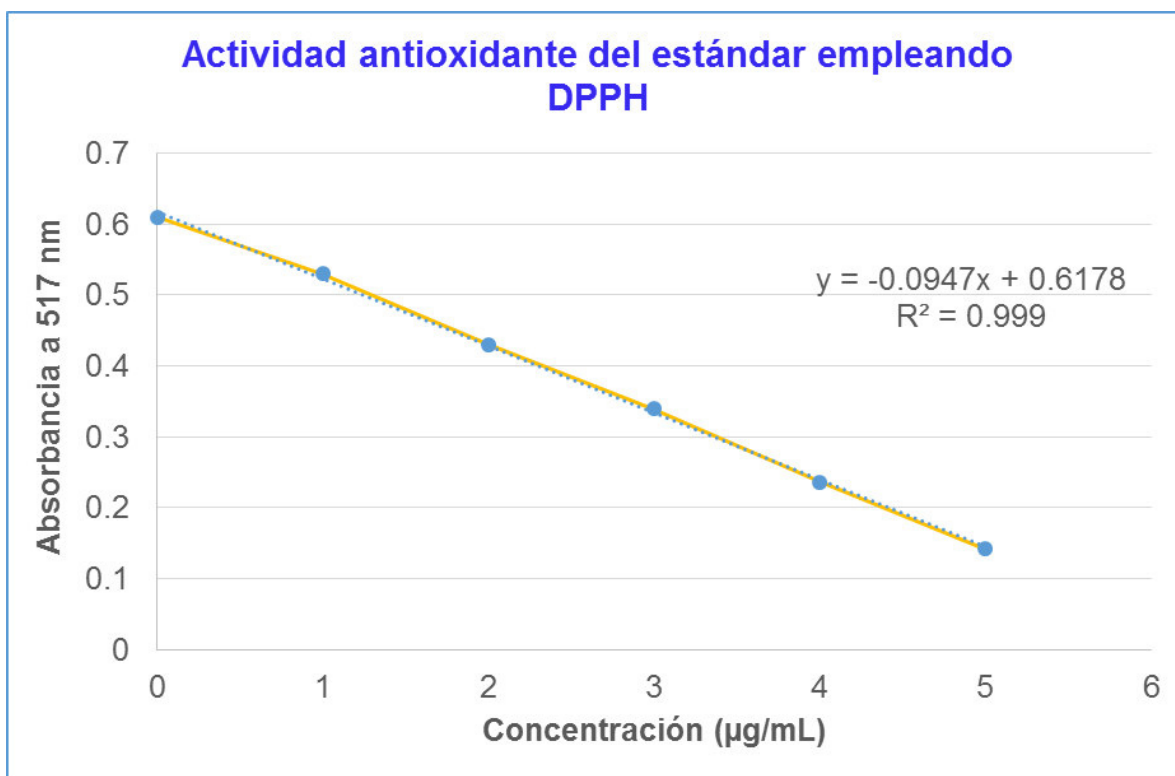
Anexo VII. Actividad antioxidante empleando radical DPPH.

Tabla 21. Actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical DPPH.

Extracto (µg/mL)	Absorbancia (Promedio)
0	0.623
2.66	0.563
5.33	0.496
8	0.434
10.66	0.380
13.33	0.325
16	0.252



IC50 = 13.58 µg/mL



IC50= 3.26 µg/mL

Figura 26. Actividad antioxidante empleando radical DPPH 1) Extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. 2) Estándar Trolox.

Fuente: Propia.



Figura 27. Actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. empleando radical DPPH.

Fuente: Propia.

Anexo VIII. Análisis estadístico del efecto antiinflamatorio *in vivo*.

Tabla 22. Test de homogeneidad de varianzas del efecto antiinflamatorio.

Test of Homogeneity of Variances				
Mediciones	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Basal (mm)	1.45	6	34	0.225
60 mint (mm)	1.18	6	34	0.341
180 mint (mm)	1.96	6	34	0.099
240 mint (mm)	1.18	6	34	0.341
300 mint (mm)	3.07	6	34	0.017
360 mint (mm)	2.27	6	34	0.060
420 mint (mm)	2.14	6	34	0.074

Tabla 23. Análisis estadístico descriptivo del efecto antiinflamatorio.

Descriptives						
Variable	Tratamiento	Mean	Porcentaje variación	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Basal (mm)	SSF	5.10		0.10	4.85	5.35
	Ibuprofeno	5.19		0.09	4.95	5.43
	Dexametasona	5.02		0.03	4.93	5.12
	Extracto 25	5.18		0.04	5.08	5.27
	Extracto 100	5.34		0.08	5.14	5.54
	Extracto 250	5.26		0.05	5.12	5.40
	Extracto 500	4.95		0.08	4.75	5.16
60 mint (mm)	SSF	8.33		0.34	7.45	9.21
	Ibuprofeno	6.48		0.26	5.82	7.14
	Dexametasona	6.04		0.11	5.74	6.35
	Extracto 25	7.71		0.21	7.16	8.25
	Extracto 100	8.61		0.29	7.86	9.35
	Extracto 250	7.73		0.30	6.97	8.50
	Extracto 500	7.85		0.16	7.42	8.27
180 mint (mm)	SSF	10.01		0.19	9.52	10.49
	Ibuprofeno	7.24		0.15	6.86	7.61
	Dexametasona	6.16		0.18	5.66	6.66
	Extracto 25	9.35		0.47	8.15	10.56
	Extracto 100	10.08		0.16	9.68	10.48
	Extracto 250	9.51		0.43	8.39	10.62
	Extracto 500	9.56		0.28	8.84	10.29
240 mint (mm)	SSF	10.70		0.20	10.18	11.22
	Ibuprofeno	8.35		0.22	7.79	8.91
	Dexametasona	7.25		0.16	6.81	7.70
	Extracto 25	8.99		0.38	8.02	9.95
	Extracto 100	10.36		0.14	9.99	10.72
	Extracto 250	9.83		0.18	9.37	10.29
	Extracto 500	9.41		0.28	8.69	10.13
300 mint (mm)	SSF	10.28		0.15	9.89	10.66
	Ibuprofeno	8.43		0.27	7.72	9.14
	Dexametasona	6.67		0.13	6.32	7.01
	Extracto 25	8.81		0.47	7.61	10.01
	Extracto 100	9.99		0.14	9.64	10.35
	Extracto 250	9.68		0.23	9.08	10.28
	Extracto 500	9.16		0.23	8.57	9.75
360 mint (mm)	SSF	10.74		0.21	10.21	11.27
	Ibuprofeno	8.18		0.28	7.46	8.90
	Dexametasona	6.73		0.16	6.29	7.17
	Extracto 25	8.54		0.46	7.36	9.71
	Extracto 100	9.97		0.20	9.46	10.47
	Extracto 250	9.22		0.19	8.74	9.71
	Extracto 500	8.66		0.39	7.66	9.66
420 mint (mm)	SSF	9.70		0.18	9.22	10.17
	Ibuprofeno	7.73		0.22	7.17	8.30
	Dexametasona	6.13		0.02	6.08	6.18
	Extracto 25	7.80		0.43	6.70	8.90
	Extracto 100	8.75		0.11	8.48	9.03
	Extracto 250	8.30		0.22	7.72	8.87
	Extracto 500	7.38		0.36	6.46	8.30

Tabla 24. Análisis de varianza (ANOVA) del efecto antiinflamatorio.

ANOVA						
Variable	Tratamiento	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Basal (mm)	Between Groups	0.63	6	0.11	3.36	0.0100
	Within Groups	1.06	34	0.03		
60 mint (mm)	Between Groups	29.37	6	4.89	12.68	0.0001
	Within Groups	13.12	34	0.39		
180 mint (mm)	Between Groups	76.10	6	12.68	24.35	0.0001
	Within Groups	17.71	34	0.52		
240 mint (mm)	Between Groups	47.12	6	7.85	23.45	0.0001
	Within Groups	11.39	34	0.33		
300 mint (mm)	Between Groups	47.89	6	7.98	19.96	0.0001
	Within Groups	13.60	34	0.40		
360 mint (mm)	Between Groups	55.63	6	9.27	18.38	0.0001
	Within Groups	17.15	34	0.50		
420 mint (mm)	Between Groups	41.64	6	6.94	17.24	0.0001
	Within Groups	13.69	34	0.40		

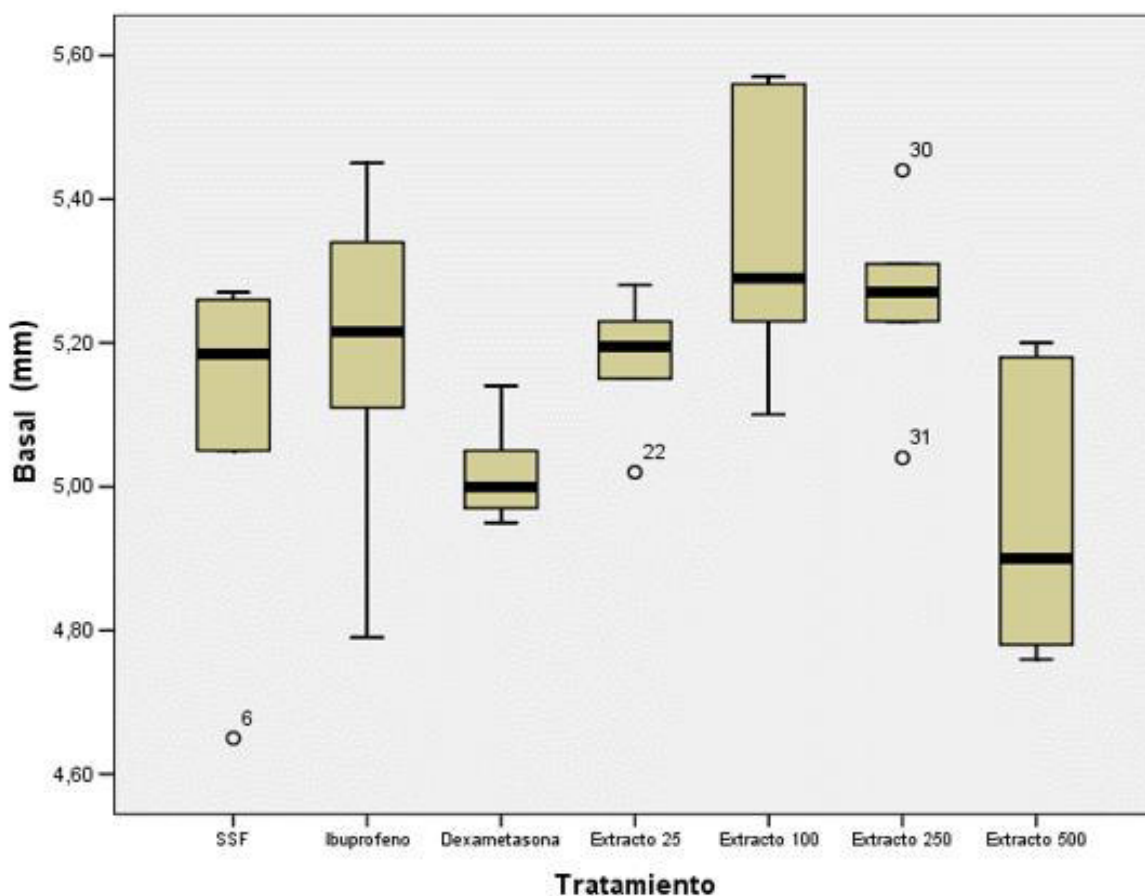


Figura 28. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio en medición basal.

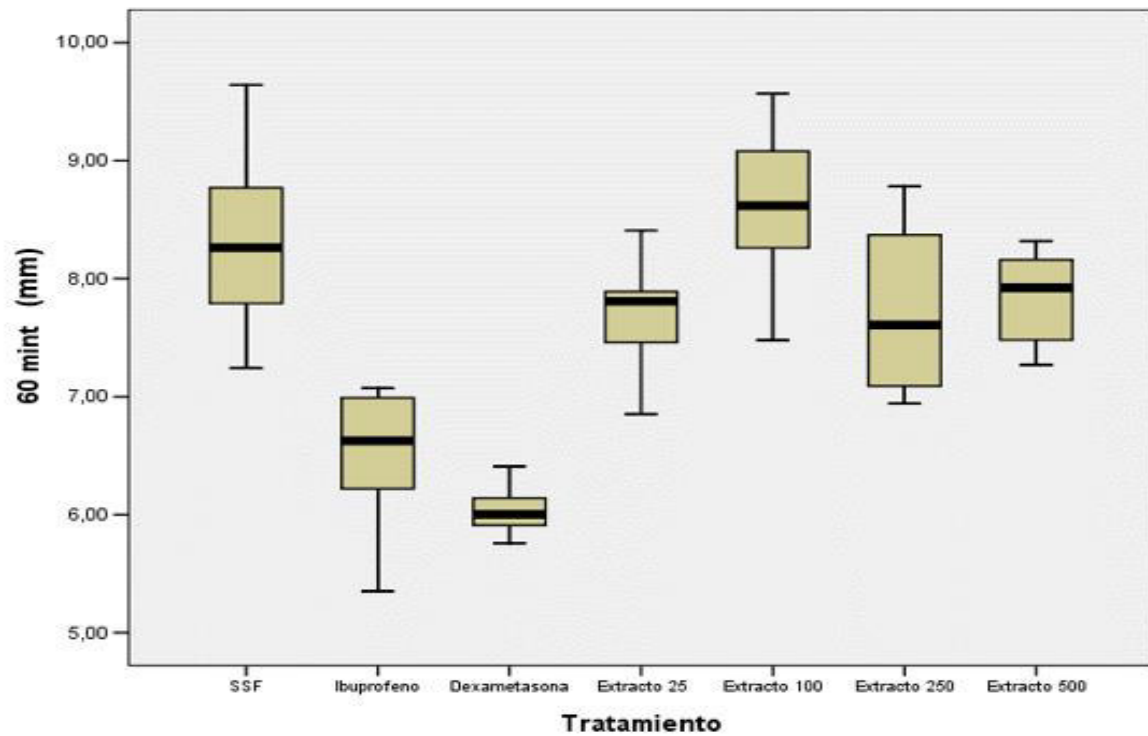


Figura 29. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 60 minutos.

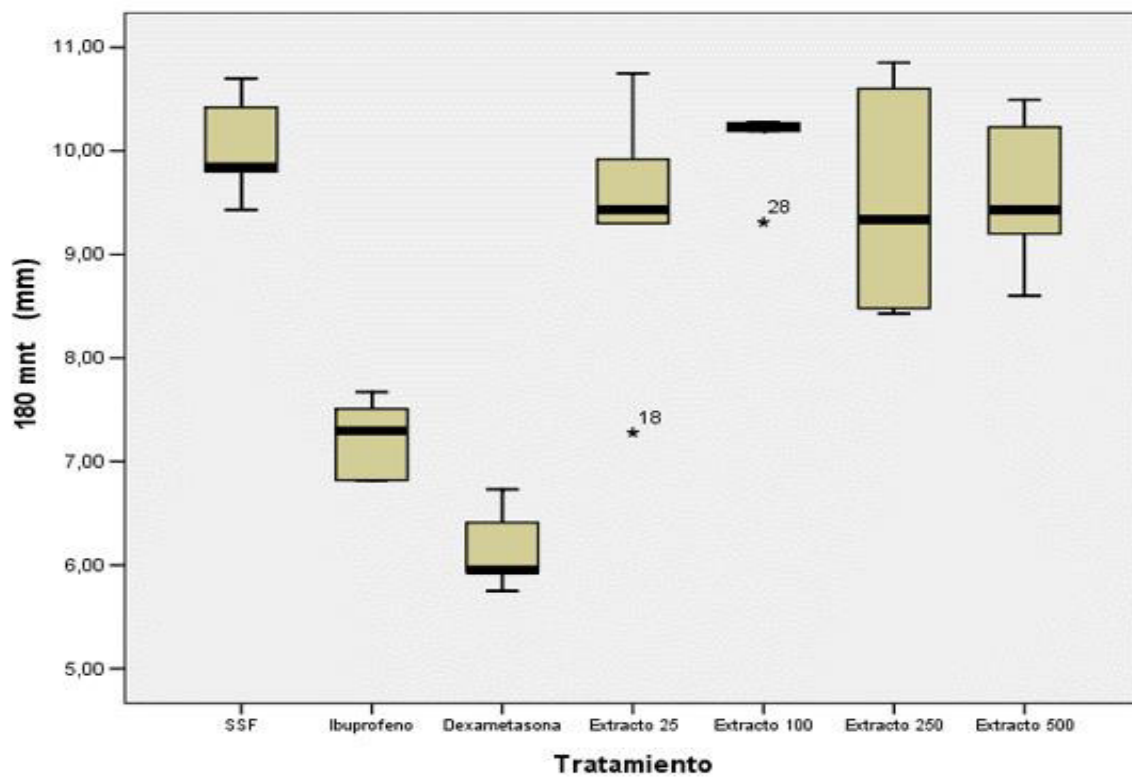


Figura 30. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 180 minutos.

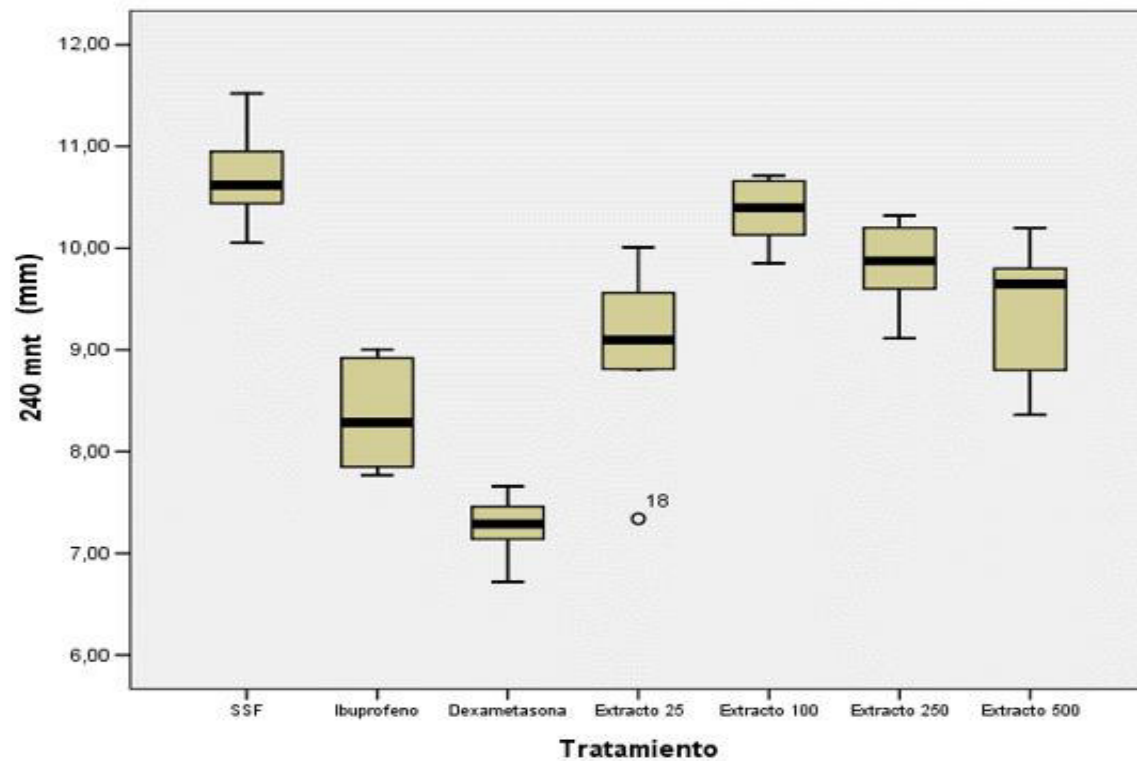


Figura 31. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 240 minutos.

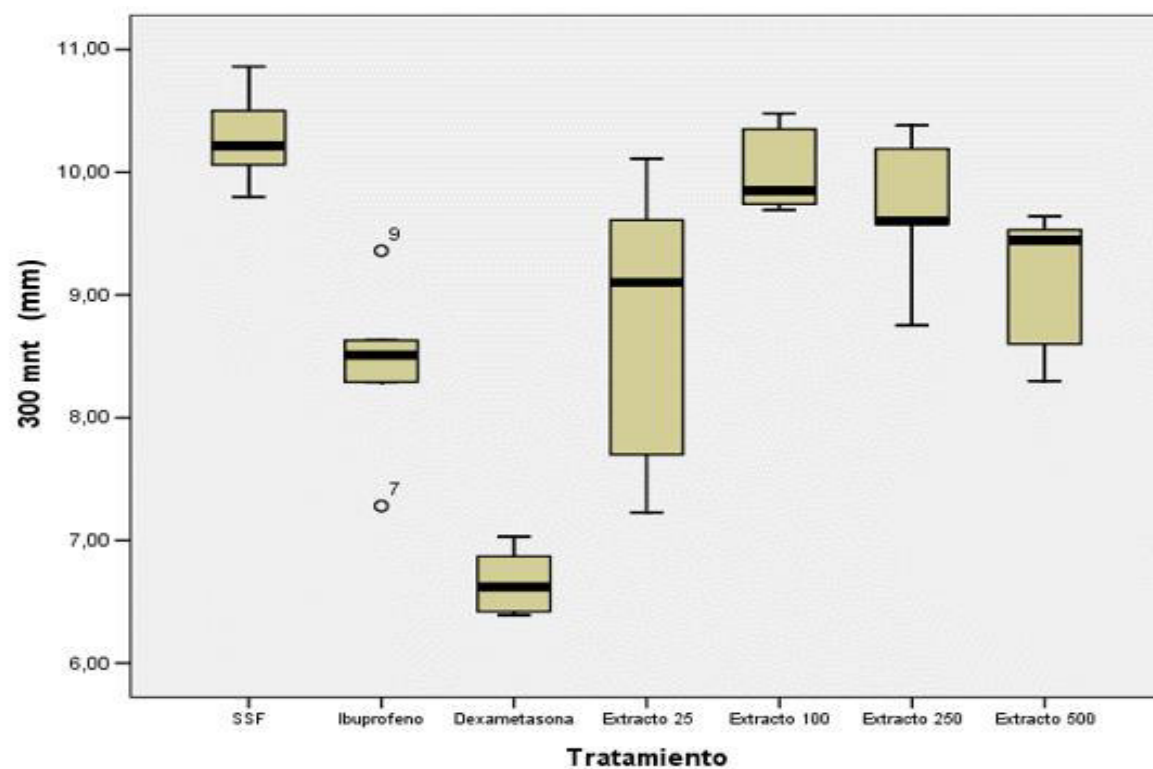


Figura 32. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 300 minutos.

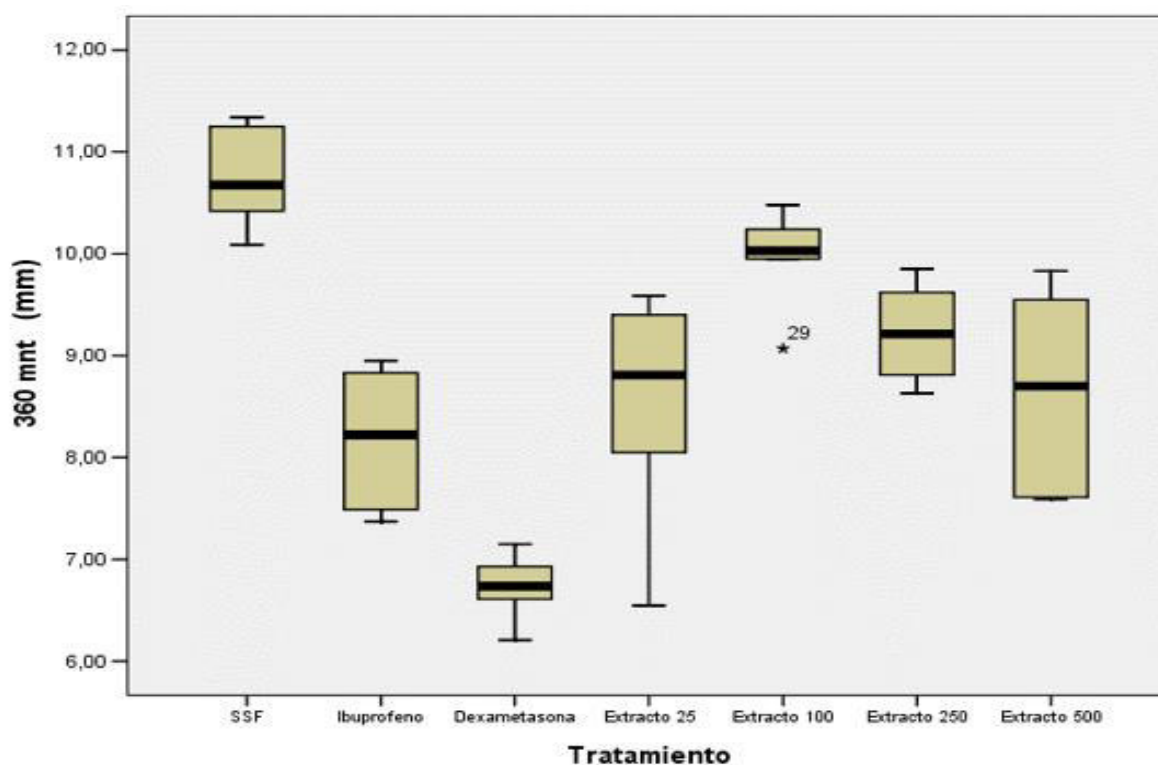


Figura 33. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 360 minutos.

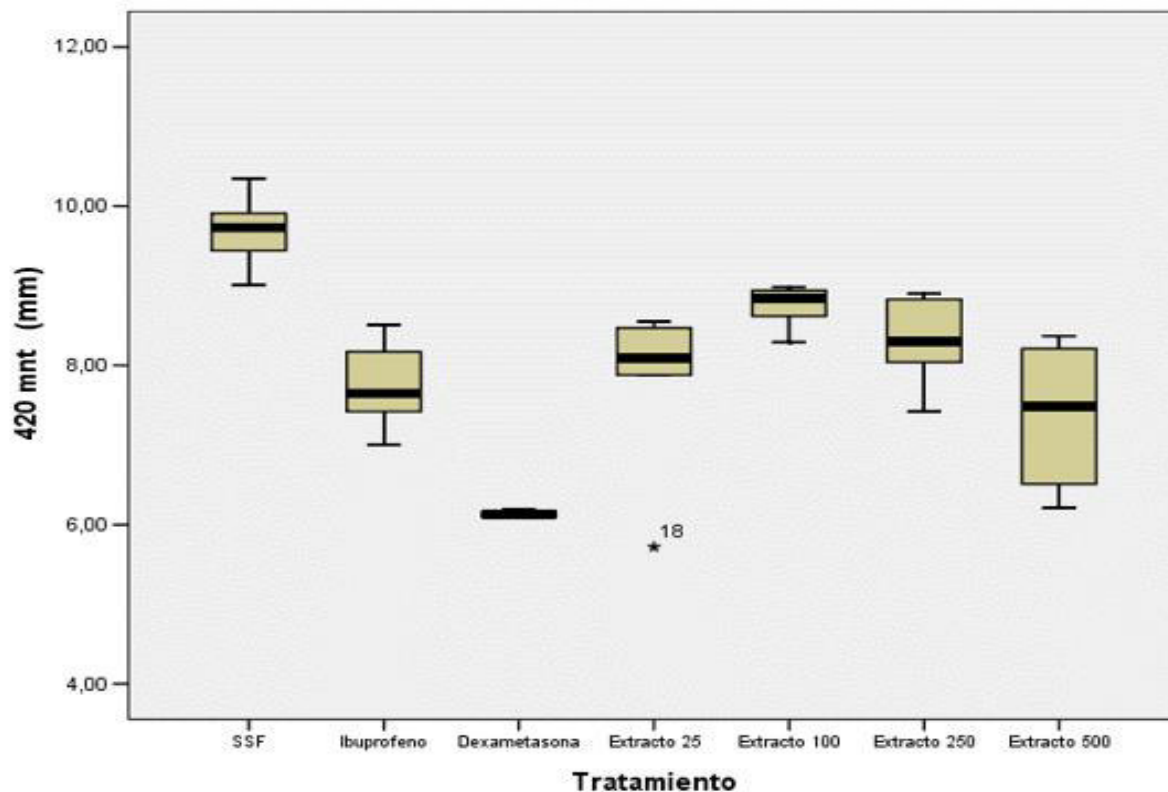


Figura 34. Diagrama de cajas del efecto antiinflamatorio a los 420 minutos.

Anexo IX. Animales utilizado en el efecto antiinflamatorio *in vivo*.



Figura 35. Ratas albinas cepa Holtzman utilizadas para la medición del efecto antiinflamatorio.

Fuente: Propia.

Anexo X. Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”



Figura 36. Asesor de la tesis: Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera. **Fuente:** Propia.



Figura 37. Investigación fitoquímica de la tesis. **Fuente:** Propia.